

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

**Sicherheit und Verträglichkeit einer niedrig-dosierten
Allergenprovokation bei Patienten mit Hausstaubmilbenallergie und
leichtem Asthma bronchiale unter Supplementierung mehrfach
ungesättigter Fettsäuren (*n*-3 PUFA)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Patrick-Carsten Sommerer
aus Bayreuth

Frankfurt am Main 2008

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. S. Zielen

Koreferent: Prof. Dr. TOF Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Asthma bronchiale	1
1.2	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (n-3 PUFA).....	2
1.3	Niedrig-dosierte Allergenbelastung	4
1.4	Zielsetzung.....	5
2	<i>Patienten und Methoden</i>	7
2.1	Patientenkollektiv	7
2.2	Versuchsdurchführung.....	9
2.2.1	Screening.....	10
2.2.1.1	Einschlusskriterien.....	10
2.2.1.2	Ausschlusskriterien	10
2.2.1.3	Ablauf der Screening-Visite	11
2.2.2	Studiendesign.....	11
2.2.2.1	exhalieretes Stickstoffmonoxid (eNO)	13
2.2.2.2	Methacholinprovokation	13
2.2.2.3	Supplementierung mit ungesättigten n-3 PUFA	15
2.2.2.4	Niedrig-dosierte Allergenbelastung	16
2.2.2.5	Blutentnahmen und BMI-Werte	17
2.2.2.6	Statistische Auswertung.....	18
3	<i>Ergebnisse</i>	19
3.1	Klinische Symptome	19
3.2	FEV ₁ -Basiswerte und bronchiale Hyperreagibilität.....	20
3.3	Akute Wirkung der niedrig-dosierten Allergenbelastung auf die FEV ₁	23
3.4	Verlaufsentwicklung des eNO	24
4	<i>Diskussion</i>	25
5	<i>Zusammenfassung</i>	36
6	<i>Summary</i>	38
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	40
8	<i>Anhang</i>	45
9	<i>Danksagung</i>	50

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ALA	Alphalinolensäure
ATS	American Thoracic Society
BMI	body mass index
DHA	Docosahexaensäure
DHGLA	Dihomogammalinolensäure
EAR	early asthmatic response (= asthmatische Frühreaktion)
EBC	exhaled breath condensate
ECP	eosinophil cationic protein
eNO	exhalierendes Stickstoffmonoxid (NO)
EPA	eicosapentaenoic acid (=Eicosapentaensäure)
FEV ₁	Einsekundenkapazität
GINA	Global Initiative For Asthma
GLA	Gammalinolensäure
IgE	Immunglobulin E
LA	Linolsäure
LAR	late asthmatic response (= asthmatische Spätreaktion)
LTB ₄ /LTB ₅	Leukotrien B ₄ / Leukotrien B ₅
MUFA	monounsaturated fatty acids (= einfach ungesättigte Fettsäuren)
NO	nitric oxide (=Stickstoffmonoxid)
PD ₂₀	Provokationsdosis, die einen FEV ₁ -Abfall um 20% bewirkte
PUFA	polyunsaturated fatty acids (= mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
RAST	radioallergosorbent test
SAFA	saturated fatty acids (=gesättigte Fettsäuren)
SD	standard deviation (= Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (= Standardfehler des Mittelwerts)
STA	Stearinsäure
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, die durch Episoden variabler und reversibler bronchialer Obstruktion charakterisiert ist [36]. Dem zugrunde liegen eine Entzündung der Atemwege, sowie eine bronchiale Hyperreagibilität. Der Ausdruck „bronchiale Hyperreagibilität“ bezeichnet eine gesteigerte Bereitschaft der Atemwege auf einen spezifischen oder unspezifischen Reiz mit einer Engstellung zu reagieren. Allgemeine auslösende Faktoren sind neben Infekten, Tabakrauch, Luftverschmutzung, Tierkontakt, körperlicher Anstrengung und/oder psychischer Faktoren, die Exposition von Hausstaubmilben, Pollen und Schimmel. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um eine allergische Entzündung, die durch rezidivierende Allergenexposition gefördert wird.

Typische Symptome sind Husten, erschwerte Atmung bzw. Atemnot und pfeifende Atemgeräusche, insbesondere nachts oder am frühen Morgen. Asthmaanfälle treten episodisch auf, die bronchiale Entzündung ist jedoch chronisch vorhanden. Daher müssen einige Patienten regelmäßig Medikamente einnehmen, um die Symptome zu kontrollieren, die Lungenfunktion zu verbessern und Anfälle zu verhindern. Darüber hinaus können Medikamente (β_2 -Sympathomimetika) benötigt werden, um akute Symptome wie Atemnot, Husten oder Pfeifen zu lindern.

Die Diagnosestellung für Asthma bronchiale basiert neben der typischen Symptomenkonstellation auf apparativen Untersuchungen. Zur Diagnosesicherung kann zunächst über mehrere Tage ein Peakflow-Protokoll geführt werden, das bei Asthmatikern PEF-Abfälle um mehr als 10% des mittleren PEF-Wertes zeigt. Durch Inhalation eines β_2 -Sympathomimetikum hingegen steigt der PEF binnen 15 bis 20 Minuten um mehr als 15% an [36]. Als allergologische Diagnostik wird neben einem konventionellen Prick-Test zur Sicherung der Diagnose allergisches Asthma bronchiale häufig eine Allergenprovokation durchgeführt. Die bronchiale Hyperreagibilität wird entweder durch eine standardisierte Laufbelastung oder nach Inhalation pharmakologischer Substanzen (Methacholin, Histamin) diagnostiziert.

Die Standardtherapie des Asthma bronchiale der Schweregrade II-IV ist gemäß der Pathophysiologie eine anti-entzündliche Therapie mit Steroiden und/oder Leukotrienantagonisten. Die Behandlung richtet sich dabei jeweils nach der individuellen Schwere der klinischen Symptome. Als Orientierung dient hierbei das Stufenschema der Atemwegsliga, welches Patienten nach der Häufigkeit von Symptomen tagsüber und nachts, sowie des Peakflow und der Einsekundenkapazität bzw. der Peakflow-Variabilität klassifiziert.

1.2 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*n*-3 PUFA)

Die Verbreitung von Asthma bronchiale ist nicht in allen Gesellschaften gleich ausgeprägt. Während in den westlichen Industrienationen die Prävalenz zunimmt, so gibt es andererseits Populationen, in denen Asthma bronchiale deutlich seltener auftritt. Epidemiologische Studien legen nahe, dass die Ernährung diesbezüglich eine wichtige Rolle spielt. Die geringe Prävalenz von atopischen Atemwegserkrankungen bei Eskimos führte man auf deren hohen Konsum an Fisch und Meeresfrüchten zurück, die reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*n*-3 PUFA) sind [22]. In diesem Zusammenhang wird insbesondere der Omega-3-Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA, 20:5*n*-3) eine wichtige Rolle zugeschrieben [1, 22, 40].

In zahlreichen Studien wurde der Stellenwert von *n*-3 PUFA unter anderem in Bezug auf die Entstehung und Ausprägung von arteriellem Hypertonus [20, 34], Asthma bronchiale [5, 32, 33, 44], familiärer Hyperlipidämie [9], Offenwinkelglaukom [44] und rheumatoider Arthritis [22] untersucht.

Bei den protektiven Fettsäuren handelt es sich um Vertreter langkettiger mehrfach ungesättigter *n*-3 Fettsäuren (*n*-3 PUFA), die in hohem Maße in Fettfisch und Fischöl zu finden sind. *n*-3 PUFA sind essentielle Bestandteile der Membranphospholipide und einige dienen als Vorläufersubstanzen von Eicosanoiden wie z.B. Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen. Die beiden Hauptklassen der PUFA sind die *n*-3- und *n*-6 Fettsäuren, die sich strukturell und funktionell unterscheiden. Typischerweise enthalten menschliche Entzündungszellen ein hohes

Maß der *n*-6 PUFA Arachidonsäure und nur geringe Mengen *n*-3 PUFA [10]. Diese Tatsache ist so wichtig, weil Arachidonsäure die Vorläufersubstanz der 2er-Serie-Prostaglandine und 4er-Serie-Leukotriene ist, beides Gruppen hochaktiver Mediatoren des Entzündungsprozesses. Durch vermehrte Aufnahme *n*-3 PUFA-reicher Nahrung kommt es zu einem teilweisen Austausch von Arachidonsäure durch *n*-3 PUFA in Zellmembranen von Entzündungszellen [17, 26]. Dieser Austausch führt nun zu einer verminderten Produktion von Mediatoren, deren Vorläufersubstanz Arachidonsäure ist. Darüber hinaus hemmt EPA die Freisetzung von Arachidonsäure aus Zellmembranen durch die Phospholipase A₂ und hemmt kompetitiv die Oxygenierung von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase [31, 38].

Zusätzlich zu dem hemmenden Effekt auf den Metabolismus von Arachidonsäure, können *n*-3 PUFA als Substrat sowohl für die Cyclooxygenase als auch die 5-Lipoxygenase fungieren [10]. Die daraus entstehenden Mediatoren unterscheiden sich sowohl strukturell als auch funktionell von den Abkömmlingen der Arachidonsäure (z.B. 3er-Serie-Prostaglandine und 5er-Serie-Leukotriene). Somit resultiert nicht nur eine Hemmung der Produktion der Arachidonsäure-Derivate, sondern darüber hinaus eine vermehrte Produktion von Eicosanoiden, die *n*-3 PUFA abstammen.

Eicosanoiden, deren Vorläufersubstanz EPA ist, wird eine geringere biologische Potenz zugeschrieben als derer, die der Arachidonsäure abstammen. „Das beste Beispiel für das unterschiedliche entzündliche Potential von Eicosanoiden produziert aus Arachidonsäure und EPA stellt LTB₄ gegenüber LTB₅ dar. LTB₅ ist als chemischer Lockstoff für Neutrophile mindestens zehnfach weniger potent als LTB₄ und kann daher als weniger proinflammatorisch betrachtet werden“ [10, 26, 40]. Des Weiteren gilt es bezüglich alternativer Eicosanoide gegenüber den Arachidonsäure-Derivaten zu berücksichtigen, dass sich diese denselben Rezeptor in Zielzellen teilen und daher die der Arachidonsäure abstammenden Mediatoren antagonisieren können.

Diese Daten stützen die Annahme, dass eine Diät reich an *n*-3 PUFA Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale modulieren kann. Klinische Daten bezüglich der Supplementierung von Fischöl bei Asthma bronchiale sind diesbezüglich jedoch widersprüchlich [56]. Während einige klinische Studien keine

Verbesserung bzw. Veränderung der klinischen Symptome des Asthma bronchiale beobachten konnten [1, 7, 21, 24, 52, 54], zeigten andere Studien eine Besserung des asthmatischen Zustands nach Supplementierung von *n*-3 PUFA [2, 8, 15, 35, 39, 55]. Daher kommt eine Cochrane Analyse zu dem Schluss, dass es nur geringfügige Beweise gibt, um Menschen mit Asthma eine Supplementierung bzw. Modifikation der Einnahme von *n*-3 Fettsäuren (Fischöl) zur Verbesserung ihres Asthma zu empfehlen [56].

1.3 Niedrig-dosierte Allergenbelastung

Allergenprovokationstests dienen einerseits der Sicherung der Diagnose eines allergischen Asthma bronchiale. Bei Atopikern kann ein Allergen (z.B. Hausstaubmilbe, Schimmelpilze, Pollen) einen allergenspezifischen Asthmaanfall auslösen. Im Gegensatz hierzu können bei unspezifischer Überempfindlichkeit des Bronchialsystems Reize wie kalte Luft oder Autoabgase auslösend für eine Bronchokonstriktion sein.

Neben der unspezifischen Überempfindlichkeit der Atemwege, welche als wesentliches diagnostisches Kriterium des Asthma bronchiale bezeichnet wird, liegt bei Atopikern eine spezifische Überempfindlichkeit auf Allergene vor. Daher können bronchiale Allergenprovokationstests genutzt werden, um den pathophysiologischen Effekt der Exposition eines Allergens auf die Atemwege zu erforschen und die Wirkung von Medikamenten und Nahrungsmittelergänzungen auf die Atemwege zu beurteilen.

Während des Provokationstests atmet der Patient ein Aerosol eines standardisierten Allergenextraktes ein. Je nach Konzentration und Dauer der Inhalation können dem Patienten auf diese Weise definierte Dosen des Allergenextraktes appliziert werden. Nach Verabreichung der jeweiligen Dosis wird die Einsekundenkapazität gemessen, um die Reaktion der Atemwege auf die Allergenexposition zu quantifizieren. Direkte Folge der Allergeninhalation ist eine Verengung der Bronchien, die langsam über die folgenden zwei Stunden zurückgeht, die sog. asthmatische Frühreaktion (EAR). Die

EAR wird hauptsächlich bedingt durch Kontraktion der glatten Muskulatur und wird vermittelt durch Histamin, Prostaglandine und Leukotriene. Bei einigen Patienten lässt sich etwa sechs bis neun Stunden nach Provokation eine weitere Reaktion der Atemwege beobachten, die sog. asthmatische Spätreaktion (LAR) [37]. Die LAR wird größtenteils bedingt durch das Einwandern von Entzündungszellen in die Bronchien und Kontraktion glatter Muskulatur.

Zwischen der Entstehung einer asthmatischen Früh- und Spätreaktion besteht eine Dosisabhängigkeit [18]. Die Dosis, die nötig ist, um eine EAR und LAR hervorzurufen wird im täglichen Leben jedoch nicht sehr oft erreicht. Für gewöhnlich wird eine bronchiale Allergenprovokation als relativ hohe Einzeldosis-Provokation durchgeführt, die möglicherweise nicht einer chronischen, natürlichen, niedrig-dosierten Allergenexposition entspricht. Chronisches allergisches Asthma bronchiale kann in der Tat als milde aber stete Form einer isoliert auftretenden LAR (ohne vorangegangene EAR) simuliert werden, induziert durch eine natürliche Exposition einer niedrigen Allergendosis [23]. Die wiederholte bronchiale Provokation mit niedrig-dosiertem Allergen hingegen, imitiert die natürliche Allergenexposition und ruft eine ausgeprägte Entzündungsantwort [27, 51] hervor. Diese Entzündungsreaktion entspricht in etwa einer maximalen Einzeldosis-Provokation, jedoch bereits bei geringerer Menge des Allergens [13, 27, 28]. Diese Daten lassen vermuten, dass sich ein möglicher kumulativer Effekt und/oder Priming durch wiederholte niedrig-dosierte Allergenbelastungen erzeugen lassen [13, 28]. Neben dem Auftreten verstärkter bronchialer Hyperreagibilität [3, 19, 51] und einer isolierten LAR [3], fanden sich bei anderen Untersuchungen eine verstärkte bronchiale Hyperreagibilität in Abwesenheit klinischer Symptome [27] und Zeichen einer Aktivierung von Entzündungszellen im peripheren Blut [6, 45].

1.4 Zielsetzung

Die bronchiale Provokation ist ein Verfahren, das dem Allergologen schon einige Dekaden zur Verfügung steht. Obwohl die spezielle Form der niedrig-dosierten bronchialen Allergenprovokation ebenfalls schon viele Jahre bekannt ist, fand diese

jedoch eine deutlich geringere Beachtung als die konventionelle Form der hoch-dosierten Einzeldosis-Provokation. Entsprechend ist die Datenlage zu diesem Thema bis dato wenig umfangreich.

Die unklare Studienlage bezüglich der Durchführung, Sicherheit und Verträglichkeit wiederholter niedrig-dosierter Allergenbelastungen im bronchialen Provokationsmodell, sowie deren Beeinträchtigung der klinischen Symptome, Lungenfunktion und bronchialen Hyperreagibilität bei Patienten mit leichtem allergischen Asthma bronchiale war Anlass zur Planung und Durchführung dieser Studie. Darüber hinaus gibt es aufgrund der momentanen Studienlage hinreichende Evidenz anzunehmen, dass eine Supplementierung mit *n*-3 PUFA möglicherweise einen protektiven Effekt auf den Entzündungsprozess bei Asthmatikern haben kann. Inwieweit sich dieser Effekt bei leichten Asthmatikern klinisch bemerkbar macht soll ebenfalls Gegenstand dieser Dissertation sein.

Die vorliegende Studie soll folgende Fragen klären:

- Ist eine wiederholte niedrig-dosierte Allergenbelastung sicher und gut verträglich?
- Kommt es zu klinischen Symptomen und einem FEV₁-Abfall?
- Haben *n*-3 PUFA einen protektiven Effekt auf die klinischen Symptome bei Hausstaubmilbenallergikern mit leichtem Asthma bronchiale?
- Verstärkt eine wiederholte niedrig-dosierte Allergenbelastung die bronchiale Hyperreagibilität?
- Und wenn ja: wie stark ist der Einfluss von *n*-3 PUFA auf die bronchiale Hyperreagibilität?

2 Patienten und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Ambulanz für pädiatrische Pneumologie und Allergologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, unter Leitung von Prof. Dr. med. S. Zielen, wählte das Patientenkollektiv nach folgenden Kriterien aus: Insgesamt 30 von 46 gescreenten Patienten zwischen 18 und 30 Jahren mit einer bekannten Hausstaubmilbenallergie und bekanntem leichtgradigen Asthma bronchiale. Die Diagnose Hausstaubmilbenallergie wurde anhand der Anamnese, eines Prick- und RAST-Test, sowie einer bronchialen Provokation mit Hausstaubmilbenallergen gestellt. Der Schweregrad leichtgradiges Asthma bronchiale der Stufe 1 wurde nach den Kriterien der WHO/GINA-Definition (WHO/GINA1) eingeteilt.

Vormedikation der Patienten mit antientzündlichen Medikamenten (Nicht-steroidale Antirheumatika / Steroide z.B. Kortison), sowie Antibiotika war für einen Zeitraum von sechs Wochen vor und bis nach Abschluss der Untersuchungen nicht gestattet. Polyallergisierung mit zeitlicher Relevanz zum Studienablauf, höhergradiges Asthma bronchiale, Vitalkapazität kleiner 80% in der Lungenfunktionsprüfung, chronisch-entzündliche Erkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises), bekannte Blutungskrankheit, Schwangerschaft, akute Erkrankungen (insbesondere im Bereich der Atemwege) und gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie waren Ausschlusskriterien.

Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt und die Patienten hatten die Möglichkeit, die Studie zu jedem Zeitpunkt abzubrechen. Alle Patienten erhielten eine ausführliche mündliche und schriftliche Aufklärung über mögliche Wirkungen und Nebenwirkungen, Ziel und Ablauf der Studie. Die Teilnahme erfolgte freiwillig mit schriftlichem Einverständnis.

Der Altersmittelwert des Gesamtkollektivs lag bei 24,0 Jahren (Standardabweichung 2,1); 16 Frauen, 14 Männer. Die Charakteristika der Patienten zeigt Tabelle 1.

Die Patienten wurden in zwei Gruppen randomisiert: Gruppe A entsprach der Verumgruppe (PUFA-Mischung angereichert mit EPA 450 mg/Tag, DHA 180 mg/Tag, GLA 60 mg/Tag und STA 60 mg/Tag; n=15), Gruppe B entsprach der Placebogruppe (Fettsäuremischung bestehend aus gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren, n=15).

Insgesamt wurden die Patienten über einen Zeitraum von fünf Wochen mit der jeweiligen Fettsäuremischung supplementiert. In den letzten beiden Wochen der Einnahme wurde werktags täglich eine niedrig-dosierte Allergenbelastung (Abfall der FEV₁ um 5%) mit Hausstaubmilbenallergen (*Dermatophagoides farinae* bzw. *Dermatophagoides pteronyssinus*) durchgeführt.

Aufgrund eines unzureichenden Anstiegs des exhalierten NO (eNO) im Laufe der ersten Woche der niedrig-dosierten Allergenbelastungen (eNO < 30ppb), wurden sieben Patienten aus der Studie ausgeschlossen (vier männliche und drei weibliche Patienten; vier aus der Placebo- und drei aus der Verumgruppe). Diese Patienten wurden als Non-Responder auf den applizierten Entzündungsreiz betrachtet und werden in den nachfolgenden Statistiken nicht berücksichtigt.

Tabelle 1: Patientencharakteristika

Patient	Sex	Alter (Jahre)	FEV ₁ (%pred)	PD ₂₀ (mg)*	Screening Allergen Dosis (U) [†]	“Low-Dose” Allergen Dosis (U) [‡]	spez. IgE (IU/ml)
Verum							
1	W	24	109,4	0,38	510	110	412
3	M	24	110,8	1,63	190	50	170
5	M	25	93,3	0,05	39	20	27
9	W	22	101,3	0,19	52	5	387
12	W	22	126,6	0,62	80	40	246
13	M	25	111,8	1,56	228	50	43
16	W	26	128,6	2,47	131	80	138
18	W	19	99,1	0,24	278	20	246
21	W	26	120,4	2,93	630	110	25
27	M	24	95,8	0,53	150	5	67
29	W	29	117,4	0,37	269	110	49
31	M	23	127,3	0,71	150	110	37
(G) Mittel ± (G)SD [§]		24,0 ± 2,5	111,2 ± 12,5	0,6 ± 1,0	167,8 ± 180,1	38,8 ± 42,9	98,1 ± 114,0
Placebo							
2	W	22	114,2	1,13	950	230	655
6	M	24	99,5	1,33	184	50	43
8	M	24	100,0	0,41	80	55	49
11	M	26	97,4	0,31	250	50	42
17	W	22	96,1	0,33	310	20	115
19	W	25	102,1	0,71	231	50	213
22	M	23	112,8	0,68	290	50	222
23	W	22	118,8	0,64	202	20	24
25	W	24	105,7	0,36	630	110	8
28	W	26	110,2	0,23	509	110	59
30	M	23	109,7	2,93	384	50	7
(G) Mittel ± (G)SD		23,7 ± 1,5	105,8 ± 7,6	0,6 ± 0,8	300,5 ± 247,8	56,6 ± 60,0	58,2 ± 189,6

Abkürzungen: U = Units (Einheiten); FEV₁ = Einsekundenkapazität;

* PD₂₀ = Bronchiale Hyperreagibilität auf Methacholin (Provokationsdosis, die einen 20%igen Abfall der FEV₁ verursacht), gemessen zu Beginn der Studie (V1)

† Allergendosis, die einen 20%igen Abfall der FEV₁ verursacht; gemessen in U

‡ Allergendosis, die zu einem 5%igen Abfall der FEV₁ führen soll; gemessen in U

§ entspricht dem (geometrischen) Mittel ± (geometrischer) Standardabweichung

2.2 Versuchsdurchführung

Die Studie wurde im Zeitraum Mai 2004 bis Oktober 2004 durchgeführt und gliederte sich für die Patienten in einen Screening-Tag, sowie 12 Visitentage, an denen sie jeweils in der Klinik erscheinen mussten. Es handelte sich um eine doppelblinde, randomisierte und Placebo-kontrollierte Studie.

2.2.1 Screening

2.2.1.1 Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 30 Jahren
- Sensibilisierung gegenüber *Dermatophagoides farinae* oder *Dermatophagoides pteronyssinus* sowohl im Prick- als auch im RAST-Test
- Hausstaubmilbenallergie und leichtgradiges Asthma bronchiale nach den Kriterien der WHO/GINA-Definition (WHO/GINA1) (Verifizierung mittels bronchialer Provokation mit Milbenallergen)

2.2.1.2 Ausschlusskriterien

- Vormedikation der Patienten mit antientzündlichen Medikamenten (z.B. Nicht-steroidale Antirheumatika, Steroide), sowie Antibiotika im Zeitraum von sechs Wochen vor und bis nach Abschluss der Untersuchungen
- Polysensibilisierung gegenüber Allergenen mit zeitlicher Relevanz zum Studienzeitraum (saisonale Allergene können die allergische Entzündung beeinflussen, daher Ausschluss bei einem eNO-Basiswert > 30ppb)
- Höhergradiges Asthma bronchiale mit regelmäßigem Gebrauch von Bronchospasmolytika und inhalativem Kortison
- Chronisch-entzündliche Erkrankungen (z.B. M. Crohn, Colitis ulcerosa, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises)
- Vitalkapazität kleiner 80% in der Lungenfunktionsprüfung
- Abfall der Einsekundenkapazität um weniger als 20% des Basiswertes während der Screeningprovokation
- Unzureichender Anstieg des eNO innerhalb der ersten Woche der niedrig-dosierten Provokationen (eNO < 30ppb)
- bekannte Blutungskrankheit
- bei weiblichen Patienten: Schwangerschaft oder Stillphase
- akute Erkrankungen (insbesondere im Bereich der Atemwege) bis 6 Wochen vor und bis nach Abschluss der Untersuchungen
- gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie

2.2.1.3 Ablauf der Screening-Visite

Am Screening-Tag wurden folgende Basisdaten erhoben: Alter, Körpergröße, Körpergewicht, BMI, exhalierendes NO, Spirometrie, Prick-Test (Firma Allergopharma, Reinbek, Deutschland). Eine Monosensibilisierung gegenüber *Dermatophagoides farinae* bzw. *Dermatophagoides pteronyssinus* war erwünscht, jedoch kein zwingendes Kriterium, sofern nur eine Pollenallergie vorlag, die keine zeitliche Relevanz zum Studienzeitraum aufwies. Bei positivem Prick-Test und Erfüllung der Altersanforderung, sowie Nichterfüllung der Ausschlusskriterien wurde eine spezifische bronchiale Provokation mit Hausstaubmilbenallergen (*Dermatophagoides farinae*- bzw. *Dermatophagoides pteronyssinus*-Extrakt der Firma Allergopharma, Reinbek, Deutschland, gelöst in 0,9% Kochsalzlösung) durchgeführt.

Lediglich bei einem Abfall der Einsekundenkapazität um mindestens 20% des Basis- FEV_1 -Wertes im Verlauf der Provokation erfolgte eine Aufnahme des Patienten in die Studie. Darüber hinaus wurde zur Durchführung eines RAST, sowie zur Bestimmung der Sicherheitsparameter eine Blutentnahme vorgenommen.

2.2.2 Studiendesign

Studienbeginn war frühestens sieben Tage nach der Screening-Visite, insgesamt wurden 12 Visiten durchgeführt. Zu Beginn der Studie wurden die Patienten zur Visite 1 (V1) eingeladen, hier wurden ihnen die Fettsäurekapseln für die ersten drei Wochen Studiendauer ausgehändigt. Auf Visite 1 folgte eine dreiwöchige Aufsättigungsphase, während derer die Patienten lediglich die Fettsäurekapseln einzunehmen hatten und nicht in der Klinik erscheinen mussten. Drei Wochen nach Visite 1 (Tag -21) erschienen die Patienten zu Visite 2 (Tag 1), wobei den Patienten die Fettsäurekapseln für die übrigen zwei Studienwochen ausgehändigt wurden.

Über einen Zeitraum von fünf Wochen nahmen die Patienten morgens und abends selbständig jeweils fünf Kapseln mit EPA angereicherter PUFA-Mischungen bzw. Placebo (Olivenöl) ein. Zu den Visiten 1, 2 und 12 (Tag -21, Tag 1, Tag 15) wurde exhalierendes NO [12] gemessen, eine Methacholin-Provokation [49] durchgeführt,

sowie Atemkondensat (EBC) und Sputum gewonnen. Die Gewinnung des Sputums erfolgte eine Stunde nach der Methacholin-Provokation [47]. Der Ablauf von Visite 7 (Tag 8) entsprach den Visiten 1,2 und 12 mit dem Unterschied, dass zur Visite 7 kein Atemkondensat und kein Sputum gewonnen wurden. Darüber hinaus erfolgten an den Visiten 1, 2, 7 und 12 jeweils Blutentnahmen. In den letzten beiden Studienwochen mussten die Patienten wochentags täglich zu den Visiten 2 – 6 (Tag 1 – 5) und 7 – 11 (Tag 8 – 12) erscheinen. An diesen Visitentagen wurde exhalierendes NO gemessen, die spirometrischen Basisdaten erhoben, sowie eine niedrig-dosierte bronchiale Allergenprovokation mit einer errechneten Dosis an Hausstaubmilbenallergen durchgeführt. Die Abschlussvisite V12 (Tag 15) fand exakt fünf Wochen nach Visite 1 (Tag -21) statt. Eine detaillierte Übersicht der verschiedenen Visiten ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Über den gesamten Studienzeitraum dokumentierten die Patienten den Gebrauch von kurzwirksamen inhalativen β_2 -Sympathomimetika (9,8 μg Formoterol) und das Auftreten klinischer Beschwerden.

Tabelle 2: Studiendesign

Visite	V1	V2	V3	V4	V5	V6
	Montag	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
Tag	-21	1	2	3	4	5
Provokation	eNO	eNO	eNO	eNO	eNO	eNO
	FEV ₁	FEV ₁	FEV ₁	FEV ₁	FEV ₁	FEV ₁
	PD ₂₀ *	Allergen [†]	Allergen	Allergen	Allergen	Allergen
	Sputum / EBC Labor	PD ₂₀ Sputum / EBC Labor				
Visite	V7	V8	V9	V10	V11	V12
	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Montag
Tag	8	9	10	11	12	15
Provokation	eNO	eNO	eNO	eNO	eNO	eNO
	FEV ₁	FEV ₁	FEV ₁	FEV ₁	FEV ₁	FEV ₁
	Allergen	Allergen	Allergen	Allergen	Allergen	PD ₂₀
	PD ₂₀ Labor					Sputum / EBC Labor

Abkürzungen: eNO = exhalierendes Stickstoffmonoxid; FEV₁ = Einsekundenkapazität;

EBC = exhaled breath condensate (Atemkondensat)

* PD₂₀ = Provokationsdosis Methacholin, die einen 20%igen Abfall der FEV₁ verursacht

† Niedrig-dosierte Allergenbelastung

2.2.2.1 exhalierendes Stickstoffmonoxid (eNO)

Die Messung des eNO der unteren Atemwege im exhalierenden Atemgas ist eine Methode zur Verlaufsbeurteilung der bronchialen Entzündung bei allergischem Asthma. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde die NO-Konzentration in der Ausatemluft mit Hilfe eines Chemiluminescence analyzers (NIOX® Nitric Oxide Monitoring System, Aerocrine, Schweden) bestimmt. Das Gerät arbeitete mit NO-freier Luft (gefilterte Inhalationsluft), um eine Kontamination mit hohen NO-Werten in der Raumluft zu verhindern. Der Patient inhalierte bis zum Erreichen der totalen Lungkapazität gefilterte Luft aus dem Gerät und atmete anschließend langsam und bei möglichst konstantem Fluss über einen Zeitraum von 10 Sekunden ohne Absetzen des Mundstückes in das Gerät zurück. Das System regulierte die Exhalation auf einen konstanten Fluss von 50 ml/s. Der NO-Wert wurde durch Ermittlung eines Plateau-Wertes entsprechend den ATS Kriterien [42] vollautomatisch vom Gerät berechnet.

Ein zu kurzes Zeitintervall zwischen einer spirometrischen Messung und einer NO-Bestimmung kann in falsch-niedrigen NO-Werten resultieren. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung des NO-Wertes stets zu Beginn einer jeden Visite durchgeführt, bei Visiten mit Blutentnahme direkt im Anschluss an die Blutentnahme. Die Messungen wurden zu jeder Visite, sowie beim Screening durchgeführt; Einzelwerte sind dem Anhang zu entnehmen.

2.2.2.2 Methacholinprovokation

Aufgrund der Tatsache, dass Asthma bronchiale eine episodische Erkrankung ist können Patienten im anfallsfreien Intervall klinisch wie funktionsanalytisch Normalbefunde aufweisen. Da bei Vorliegen einer bronchialen Hyperreagibilität das Bronchialsystem auf alle möglichen Reize reagiert, wurde ein unspezifisches Provokationsverfahren zur Diagnostik herangezogen. Als Reizstoffe zur bronchialen Provokation werden Methacholin und Histamin eingesetzt. Methacholin hat den

Vorteil, dass es rascher abgebaut wird als Histamin und so gut wie keine Nebenwirkungen hat.

An den Visiten 1, 2, 7 und 12 (Tag -21, 1, 8, 15) wurde bei unseren Patienten eine Methacholinprovokation durchgeführt. Das Methacholin wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Lösung ist bei einer Lagerung bei 4 Grad Celsius 3 Monate haltbar. Verwendet wurde eine mittlere Methacholinkonzentration (8 mg/ml), von der bekannt ist, dass Gesunde wenn überhaupt nur geringfügig mit einem Anstieg der Strömungswiderstände und entsprechendem Abfall der FEV₁ reagieren. Die Stärke des Abfalls der FEV₁ ist das Maß der bronchialen Empfindlichkeit.

Die Lösung wurde über ein Aerosol-Provokations-System (VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg) vernebelt und dem Patienten über einen Triggermechanismus während der Inspirationsphase bronchial appliziert. Der Patient war dabei über ein auswechselbares Mundstück an die Apparatur angeschlossen, das mit den Lippen dicht umschlossen werden musste. Eine Nasenklammer verschloss währenddessen beide Nasenöffnungen.

Die Methacholin-Applikation erfolgte stufenartig einem Provokationsprotokoll folgend. Unser Protokoll sah bis zu fünf Dosisapplikationen vor, beginnend bei 0,025 mg Methacholin, wobei sich ab Stufe drei mit 0,4 mg Methacholin in den folgenden zwei Stufen die jeweils verabreichten Dosen stets verdoppelten (0,025 mg / 0,1 mg / 0,4 mg / 0,8 mg / 1,6 mg). Nach den jeweiligen Provokationsstufen wurden nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten anhand eines computergestützten standardisierten Spirometers (MasterScreen Aerosol-Provokations-System, VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg) die Spirometrie gemessen und die Einsekundenkapazität (FEV₁) sowie andere Lungenfunktionsparameter mit den Ausgangswerten verglichen. Dem Provokationsprotokoll wurde solange gefolgt, bis die FEV₁ um mehr als 20% abgefallen war. Anschließend wurden ein inhalatives kurzwirksames β_2 -Sympathikomimetikum appliziert und in zehnminütigen Abständen Kontrollmessungen durchgeführt, solange bis die Ausgangswerte wieder erreicht waren. Im Bedarfsfall wurde die β_2 -Sympathikomimetikumgabe wiederholt.

Als Maßstab für die obig beschriebene Methode gilt die Dosis Methacholin, bei der ein FEV₁-Abfall um 20% eintritt (PD₂₀, siehe Tabelle 1). Die jeweilige PD₂₀ wurde vom Computer exakt und automatisch aus dem Protokoll der Provokation ermittelt.

2.2.2.3 Supplementierung mit ungesättigten *n*-3 PUFA

Über einen Zeitraum von fünf Wochen nahmen die Patienten morgens und abends selbständig jeweils fünf Kapseln mit EPA angereicherter *n*-3 PUFA-Mischungen bzw. Placebo (Olivenöl) ein. Das Verum enthielt eine Mischung langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren, bestehend aus Eicosapentaensäure (EPA), Docosahexaensäure (DHA), Gammalinolensäure (GLA) und Stearinsäure (STA). Das Placebo enthielt eine Fettsäuremischung bestehend aus gesättigten und einem geringen Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung der Fettsäurekapseln

Fettsäure	Verum (mg/Kapsel)	Verum (wt%)	Placebo (mg/Kapsel)	Placebo (wt%)
SAFA	24,50	7,00	105,00	30,00
MUFA	136,50	39,00	164,50	47,00
C18:2 <i>n</i> -6 (LA)	45,00	13,00	49,00	14,00
C18:3 <i>n</i> -3 (ALA)	10,00	3,00	3,50	1,00
C18:3 <i>n</i> -6 (GLA)	6,00	2,00	0,00	0,00
C18:4 <i>n</i> -3 (STA)	6,00	2,00	0,00	0,00
C20:4 <i>n</i> -6 (AA)	1,05	0,30	0,00	0,00
C20:5 <i>n</i> -3 (EPA)	45,00	13,00	0,00	0,00
C22:6 <i>n</i> -3 (DHA)	18,00	5,00	0,00	0,00
PUFA	131,05	38,30	52,50	15,00
<i>n</i> -3/ <i>n</i> -6	1,52		0,07	

Abkürzungen: SAFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids;

LA = Linolsäure; ALA = Alpha-Linolenolensäure; GLA = Gammalinolensäure;

AA = Arachidonsäure; EPA = Eicosapentaensäure;

DHA = Docosahexaensäure; PUFA = polyunsaturated fatty acids

Die Kapseln besaßen dieselbe Größe (14 x 4 mm), dieselbe Farbe und waren dementsprechend äußerlich nicht zu unterscheiden. Zur Verlaufsbeobachtung der Aufsättigung der Fettsäuren, sowie zur Überprüfung der Compliance der Patienten bezüglich der regelmäßigen Einnahme der Kapseln, wurde zu den Visiten V1, V2, V7 und V12 die Konzentration der supplementierten Fettsäuren im Blutplasma gemessen.

2.2.2.4 Niedrig-dosierte Allergenbelastung

In den letzten beiden Studienwochen wurden wochentags zu den Visiten 2 – 6 (Tag 1 – 5) und 7 – 11 (Tag 8 – 12) täglich die spirometrischen Basisdaten erhoben, sowie anschließend eine niedrig-dosierte bronchiale Allergenprovokation mit einer errechneten Dosis an Hausstaubmilbenallergen durchgeführt. Es wurde jeweils die gleiche Charge verwendet, die auch bei der Screening-Visite verwendet wurde (*Dermatophagoides farinae*- bzw. *Dermatophagoides pteronyssinus*-Extrakt der Firma Allergopharma, Reinbek, Deutschland, gelöst in 0,9% Kochsalzlösung).

Die Lösung wurde über ein Aerosol-Provokations-System (VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg) vernebelt und dem Patienten über einen Triggermechanismus während der Inspirationsphase bronchial appliziert. Der Patient war dabei über ein auswechselbares Mundstück an die Apparatur angeschlossen, das mit den Lippen dicht umschlossen werden musste. Eine Nasenklammer verschloss währenddessen beide Nasenöffnungen.

10 Minuten nach der Provokation wurden anhand eines computergestützten standardisierten Spirometers (MasterScreen Aerosol-Provokations-System, VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg) die Spirometrie gemessen und die Einsekundenkapazität (FEV₁) sowie andere Lungenfunktionsparameter mit den Ausgangswerten verglichen. Die Messungen der Lungenfunktionsparameter erfolgten somit vor und nach Inhalation des Allergens.

Die jeweils applizierte Dosis (siehe Tabelle 1) errechnete sich als arithmetisches Mittel aus den beiden Dosisstufen der spezifischen Screening-Provokation, zwischen denen es zu einem fünfprozentigen Abfall der Einsekundenkapazität (FEV_1) kam. Ein Beispiel der Berechnung ist in Abb.1 dargestellt.

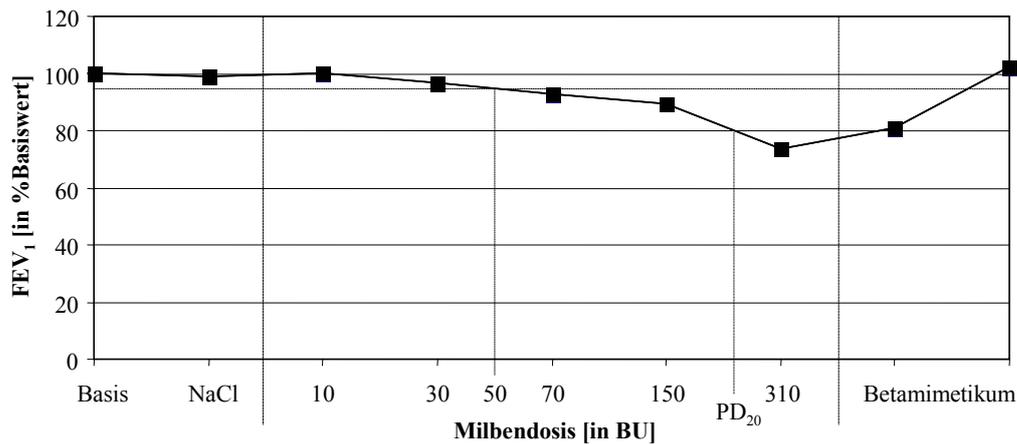


Abb. 1: Ermittlung der Niederdosis

Die Abbildung zeigt exemplarisch das Screening-Protokoll der FEV_1 -Werte von Patient Nr. 13. Die gestrichelte horizontale Linie markiert den fünfprozentigen Abfall der FEV_1 , die fein gestrichelte vertikale Linie markiert die daraus resultierende Niederdosis; die PD_{20} ist ebenfalls abgebildet

2.2.2.5 Blutentnahmen und BMI-Werte

Die Blutentnahmen erfolgten bei den Visiten 1, 2, 7 und 12 (Tag -21, 1, 8 und 15) jeweils zu Beginn. Es wurden folgende Laborparameter bestimmt: Klinische Chemie, großes Blutbild, Gerinnungsparameter, ECP, Gesamt-IgE.

Darüber hinaus wurde bei der initialen Blutentnahme noch ein RAST durchgeführt, um die Sensibilisierungen zu objektivieren.

Der Body-Mass-Index wurde aus Körpergröße und Gewicht ermittelt: $BMI = \text{kg/m}^2$. Aus den Werten der einzelnen Patienten wurden gruppenbezogene Durchschnittswerte ermittelt. Diese sind dem Anhang zu entnehmen.

2.2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung wurde mittels des Programms SPSS für Windows® 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois/USA) vorgenommen. Als Lokalisationsmaß wurde der Mittelwert (\pm Standardfehler des Durchschnittes [SEM]) verwendet. Verläufe innerhalb einer Gruppe wurden mittels des Einstichproben-t-Test untersucht, Vergleiche zwischen den Gruppen mittels des Zweistichproben-t-Test. Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung des Pearson Korrelationskoeffizienten vorgenommen. Der Mixed-Model ANOVA wurde benutzt zur Ermittlung von Abweichungen zwischen und innerhalb der Gruppen und zwischen den Studienwochen bei FEV1, PD20 und eNO-Werten.

Wahrscheinlichkeitswerte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 *Ergebnisse*

3.1 **Klinische Symptome**

Die niedrig-dosierten spezifischen Provokationen wurden von allen Patienten gut vertragen. Während des gesamten Studienzeitraumes berichteten lediglich vier Patienten der Placebogruppe über Husten, drei dieser Patienten hatten diese Beschwerden während der Phase der niedrig-dosierten Allergenbelastungen.

Sowohl während der Screening-Visite als auch für die Dauer der niedrig-dosierten Allergenbelastungen erhielten die Patienten, die über Husten berichteten gemittelt eine deutlich höhere Allergendosis (Werte in der Maßeinheit U: Screening: $408,8 \pm 334,9$; low-dose: $89,2 \pm 84,9$) als das Restkollektiv (Werte in der Maßeinheit U: Screening: $194,9 \pm 177,5$; low-dose: $42,0 \pm 44,6$). Diesbezüglich ergaben sich weder während der Screening-Visite ($p = 0,05$), noch während der Phase der niedrig-dosierten Allergenbelastungen ($p = 0,10$) signifikant unterschiedliche Werte.

Keiner der anderen Patienten wies klinische Symptome auf oder berichtete von subjektiven Beschwerden. Routinemäßig wurde den Patienten nach Beendigung der Visite angeboten zwei Hübe eines kurzwirksamen β_2 -Agonisten zu nehmen. Sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe war der Gebrauch kurzwirksamer β_2 -Agonisten während der beiden Wochen niedrig-dosierter Allergenbelastungen sehr gering (Abb.2).

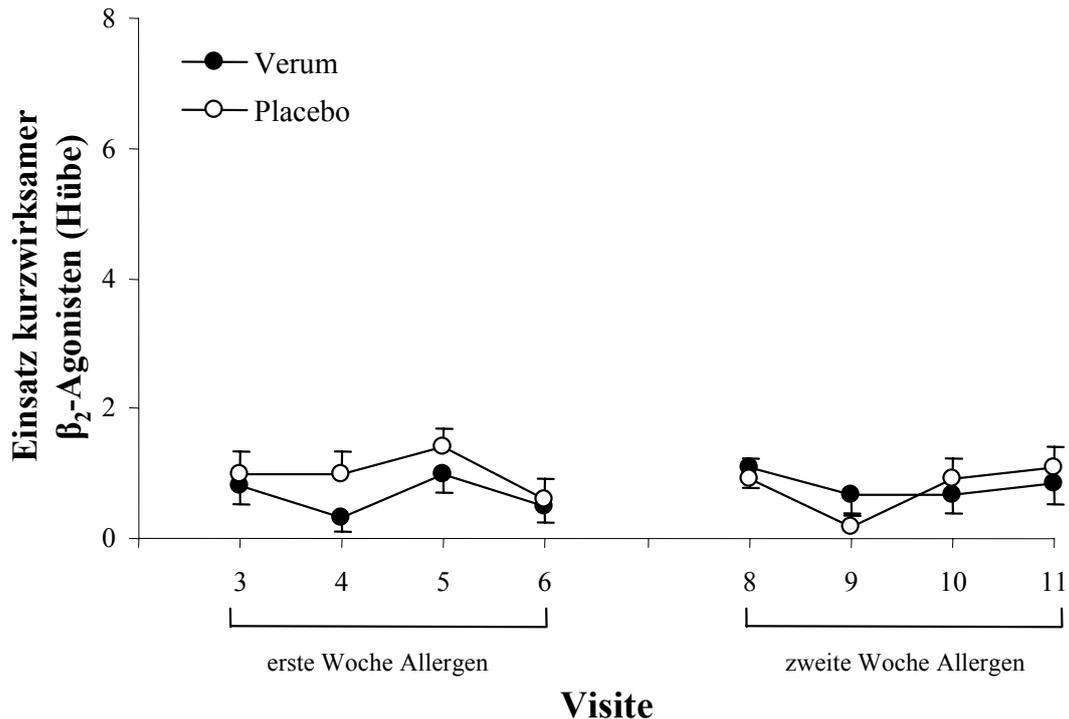


Abb. 2: Einsatz kurzwirksamer β_2 -Agonisten (Hübe)

Es wurden lediglich vier aufeinander folgende Provokationen in der Grafik angegeben, weil der ersten niedrig-dosierten Allergenprovokation zu Beginn beider Wochen (Visite 2 und Visite 7 bzw. Tag 1 und Tag 8) jeweils eine Metacholin-Provokation mit Broncholyse voranging.

3.2 FEV₁-Basiswerte und bronchiale Hyperreagibilität

Beide Gruppen wiesen über den gesamten Studienzeitraum keine signifikanten Unterschiede der gemittelten FEV₁-Basiswerte (in der Maßeinheit Liter \pm SEM: Verumgruppe: $4,27 \pm 0,26$; Placebogruppe: $4,24 \pm 0,23$) auf. Während der beiden Wochen niedrig-dosierter Allergenbelastungen (Visite 2 – 6 und Visite 7 – 11) waren weder innerhalb, noch zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede in der Einsekundenkapazität festzustellen (Abb.3). Acht der 23 Patienten (zwei aus der Verum-, sechs aus der Placebogruppe) zeigten zumindest an einem Tag eine Variabilität des FEV₁-Basiswertes $> 15\%$ des Screening-Wertes. Diese Schwankungen verteilten sich auf beide Wochen niedrig-dosierter Allergenbelastungen. Einzelne FEV₁-Werte sind dem Anhang zu entnehmen.

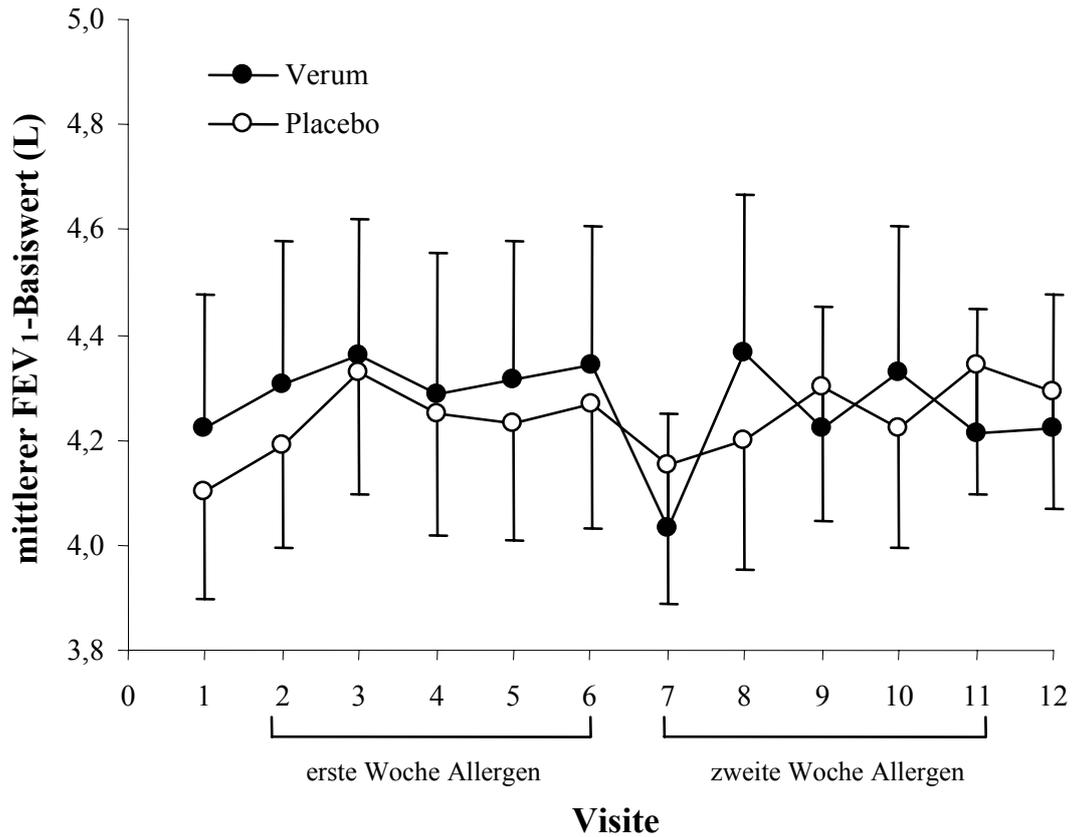


Abb. 3: Mittlere FEV₁-Basiswerte (in Litern ± SEM)

FEV₁ = Einsekundenkapazität

Die bronchiale Hyperreagibilität steigerte sich bei beiden Gruppen im Verlauf der Studie kontinuierlich. Während der beiden Wochen niedrig-dosierter Allergenbelastungen waren jedoch weder innerhalb noch zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede der bronchialen Hyperreagibilität, ausgedrückt durch den geometrischen Mittelwert der PD₂₀, festzustellen (Abb.4; Tabelle 4).

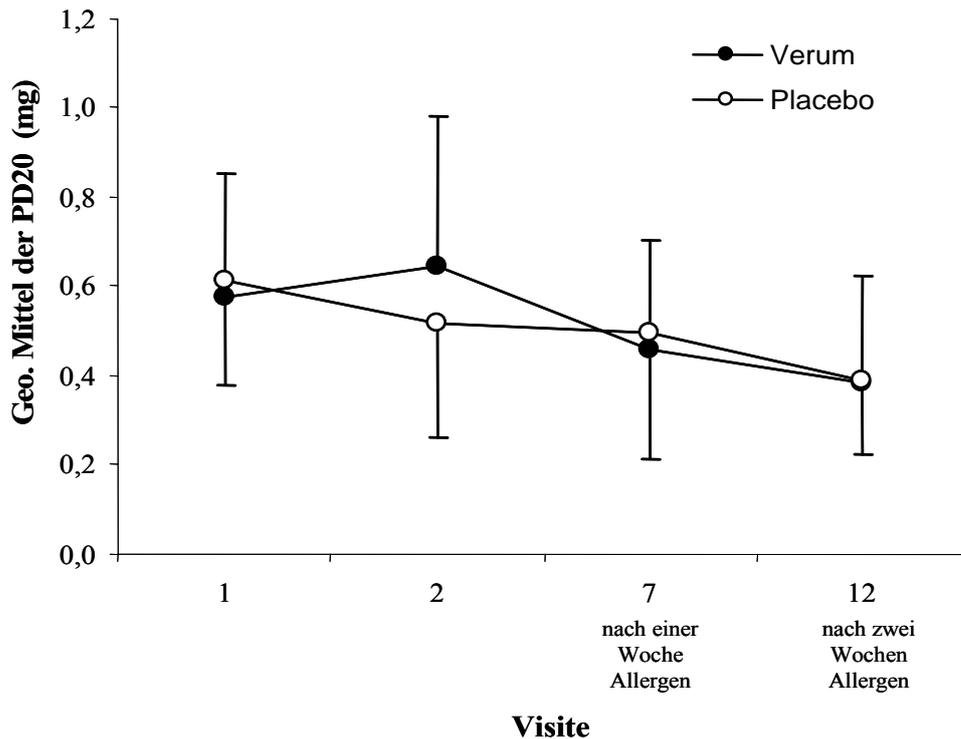


Abb. 4: Geometrisches Mittel der PD₂₀ (in mg ± SEM)

Tabelle 4: PD₂₀-Werte (in mg)

Patient	V1	V2	V7	V12	Patient	V1	V2	V7	V12
Verum					Placebo				
1	0,38	2,93	0,04	0,21	2	1,13	2,93	2,72	1,97
3	1,63	1,33	1,00	1,73	6	1,33	1,33	2,44	0,90
5	0,05	0,04	0,03	0,04	8	0,41	1,50	1,00	0,76
9	0,19	--	0,27	0,19	11	0,31	0,42	0,19	0,17
12	0,62	2,53	1,00	0,42	17	0,33	0,22	0,13	0,27
13	1,56	0,53	2,00	0,53	19	0,72	0,09	0,14	0,10
16	2,47	0,59	0,81	0,30	22	0,68	1,33	1,33	0,91
18	0,24	0,08	0,13	0,23	23	0,64	0,28	1,10	0,26
21	2,93	2,93	2,93	2,93	25	0,36	0,45	0,17	0,56
27	0,53	1,33	1,33	0,83	28	0,23	0,18	0,13	0,18
29	0,37	0,38	0,59	0,16	30	2,93	0,53	0,66	0,23
31	0,72	0,53	0,59	0,58					
(G)Mittel	0,58	0,65	0,46	0,38	(G)Mittel	0,61	0,52	0,49	0,39
SD	0,95	1,11	0,86	0,84	SD	0,78	0,86	0,94	0,55
SEM	0,27	0,33	0,25	0,24	SEM	0,24	0,26	0,28	0,17

T-Test: V1: p = 0,68; V2: p = 0,41; V7: p = 0,96; V12: p = 0,73

Abkürzungen: PD₂₀ = Provokationsdosis, die einen 20%igen Abfall der FEV₁ verursacht;

(G)Mittel = (geometrischer) Mittelwert; SD = Standardabweichung;

SEM = Standardfehler des Mittelwerts

3.3 Akute Wirkung der niedrig-dosierten Allergenbelastung auf die FEV₁

Der maximale mittlere FEV₁-Abfall (\pm SEM) innerhalb 30 Minuten nach niedrig-dosierter Allergenbelastung lag (bei alleiniger Berücksichtigung von Einzelwerten $<$ 20% FEV₁-Abfall) bei 10,11 % (\pm 1,92) in der Verumgruppe und 9,63% (\pm 2,08) in der Placebogruppe. Es gab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied im FEV₁-Abfall zwischen den Gruppen (Abb.5; Tabelle 5). Mittels ANOVA ergab sich zwischen dem mittleren FEV₁-Abfall und der PD₂₀ zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation.

Der während der niedrig-dosierten Allergenprovokationen erwünschte regelmäßige mittlere FEV₁-Abfall (\pm SEM) in Höhe von jeweils fünf Prozent wurde weder in der Verum- noch in der Placebogruppe erzielt, sondern lag im Mittel bei 5,93% (\pm 2,14) in der Verum- und 5,46% (\pm 1,75) in der Placebogruppe.

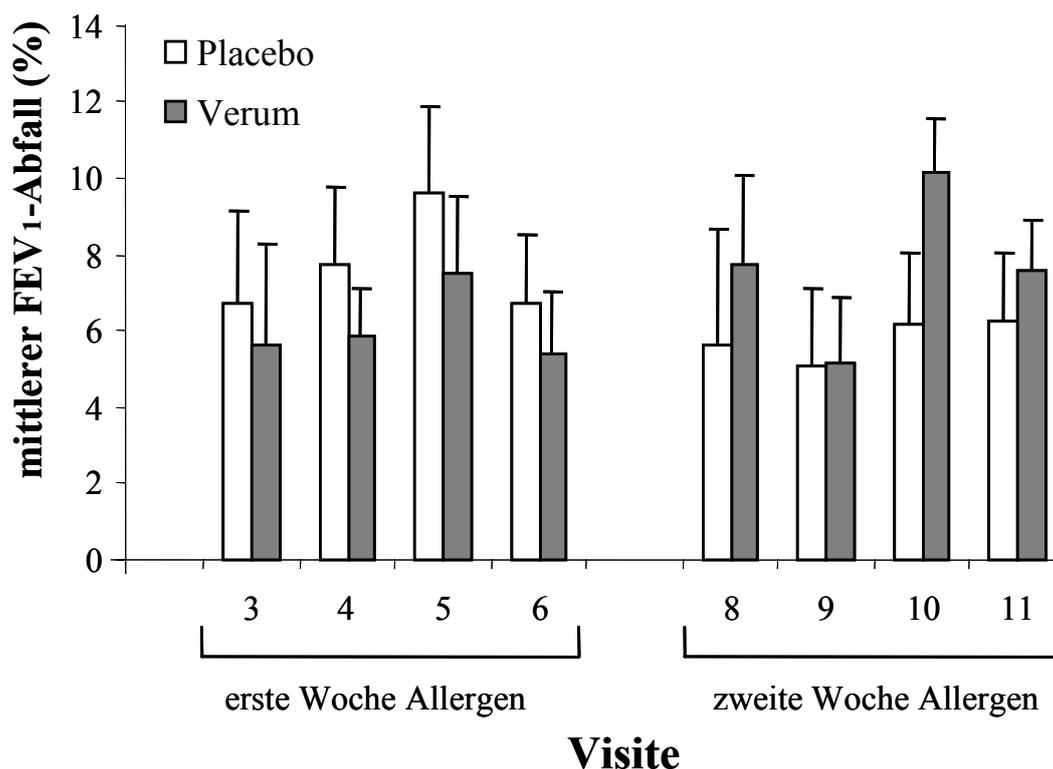


Abb. 5: Mittlerer FEV₁-Abfall (in % zum Basiswert vor Provokation \pm SEM)
Es wurden lediglich vier aufeinander folgende Provokationen in der Grafik angegeben, weil der ersten niedrig-dosierten Allergenprovokation zu Beginn beider Wochen (Visite 2 und Visite 7 bzw. Tag 1 und Tag 8) jeweils eine Metacholin-Provokation mit Broncholyse voranging.

Tabelle 5: Mittlerer FEV₁-Abfall (%)

Die unten genannten Werte geben den mittleren prozentualen Abfall der Einsekundenkapazität innerhalb 30 min nach niedrig-dosierter Allergenbelastung wieder. Die Visiten V1 und V12 sind nicht aufgeführt, da zu diesen Visiten keine niedrig-dosierte Allergenbelastung vorgenommen wurde.

Visite	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11
Verum (n = 12)										
Mittel	2,61	5,66	5,86	7,47	5,40	1,84	7,71	5,14	10,11	7,54
SEM	1,85	2,38	2,02	2,21	1,77	2,37	3,03	2,08	1,92	1,80
Placebo (n = 11)										
Mittel	1,81	6,74	7,70	9,63	6,74	-1,11	5,64	5,05	6,13	6,27
SEM	1,29	2,63	1,22	2,08	1,64	1,66	2,39	1,76	1,47	1,33
T-Test	0,73	0,76	0,47	0,49	0,58	0,35	0,59	0,97	0,12	0,59

Abkürzungen: SEM = Standardfehler des Mittelwerts

Einzelwerte > 20% FEV₁-Abfall wurden in obiger Tabelle nicht berücksichtigt

3.4 Verlaufsentwicklung des eNO

In beiden Gruppen stieg das exhalierte NO (eNO) während der Phase der niedrig-dosierten Allergenbelastungen signifikant. In der Verumgruppe war diese Erhöhung jedoch geringer ausgeprägt und die eNO-Werte (\pm SEM) waren über den gesamten Studienzeitraum niedriger. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren signifikant bei Visite 6 (Verumgruppe: 91,27 ppb \pm 16,72; Placebogruppe: 153,73 ppb \pm 21,05; $p < 0,05$) und Visite 7 (Verumgruppe: 68,07 ppb \pm 11,35; Placebogruppe: 117,44 ppb \pm 18,84; $p < 0,05$).

Die eNO-Werte der Patienten, die während des Studienzeitraumes über Husten berichtet haben, waren über die gesamte Dauer der Studie höher als die des Restkollektivs. Die Unterschiede waren signifikant bei Visite 3 (Subgruppe: 111,95 ppb \pm 25,82; Restkollektiv: 51,60 ppb \pm 6,28; $p = 0,003$), Visite 4 (Subgruppe: 143,85 ppb \pm 37,27; Restkollektiv: 80,60 ppb \pm 10,05; $p = 0,030$) und Visite 6 (Subgruppe: 184,43 ppb \pm 34,57; Restkollektiv: 107,82 ppb \pm 14,74; $p = 0,044$).

4 Diskussion

Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, die durch Episoden variabler und reversibler bronchialer Obstruktion charakterisiert ist [36]. Dem zugrunde liegen eine Entzündung der Atemwege, sowie eine bronchiale Hyperreagibilität. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um eine allergische Entzündung, die durch rezidivierende Allergenexposition gefördert wird. Bei Atopikern kann ein Allergen (z.B. Hausstaubmilbe, Schimmelpilze, Pollen) einen allergenspezifischen Asthmaanfall auslösen. Direkte Folge der Allergeninhalation ist eine Verengung der Bronchien innerhalb von 5 – 15 Minuten, die dann langsam über die folgenden zwei Stunden zurückgeht, die so genannte asthmatische Frühreaktion (EAR). Bei einigen Patienten lässt sich etwa sechs bis neun Stunden nach Provokation eine weitere Bronchialobstruktion beobachten, die noch bis zu 24 Stunden anhalten kann, die so genannte asthmatische Spätreaktion (LAR) [37].

Frolund *et al.* [18] konnten zwischen der Entstehung einer asthmatischen Früh- und Spätreaktion eine Dosisabhängigkeit feststellen. Im täglichen Leben wird die Dosis, die nötig ist, um eine EAR und LAR hervorzurufen jedoch nicht sehr oft erreicht.

Für gewöhnlich wird eine bronchiale Allergenprovokation als relativ hohe Einzeldosis-Provokation durchgeführt, die möglicherweise nicht eine chronische, natürliche, niedrig-dosierte aerogene Allergenexposition wiedergibt. Ihre *et al.* schlugen vor, dass chronisches allergisches Asthma als milde aber stete Form einer isoliert auftretenden LAR (ohne vorangegangene EAR) aufgefasst werden kann, indem es durch eine natürliche Exposition einer niedrigen Dosis des Allergens induziert wird [23].

Sowohl Lensmar *et al.* [27] als auch Sulakvelidze *et al.* [51] konnten zeigen, dass die wiederholte bronchiale Provokation mit niedrig-dosiertem Allergen eine natürliche Allergenexposition imitieren und eine ebenso ausgeprägte Entzündungsantwort hervorrufen kann, wie bei der Einzeldosis-Provokation. Die hierfür benötigte Menge des Allergens ist laut Liu *et al.* [28] jedoch wesentlich geringer.

Diese Daten lassen Liu *et al.* [28] vermuten, dass sich durch wiederholte niedrig-dosierte Allergenbelastungen möglicherweise ein kumulativer Effekt einstellt bzw. Priming stattfindet. Als Priming bezeichnet man den Effekt, dass bei wiederholter Provokation für die gleiche Reizantwort die benötigte Allergenmenge abnimmt. Dies wurde von Connell *et al.* [11] gezeigt für die repetitive intranasale Allergenprovokation. Zurückgeführt wird dieser Effekt auf das Einwandern von Entzündungszellen während der LAR [46].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sicherheit und Verträglichkeit wiederholter niedrig-dosierter Allergenbelastungen im bronchialen Provokationsmodell, sowie deren Beeinträchtigung der klinischen Symptome, Lungenfunktion und bronchialen Hyperreagibilität bei Patienten mit leichtem allergischen Asthma bronchiale untersucht. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Studie war es in diesem Zusammenhang den Einfluss einer Diät reich an *n*-3 PUFA zu betrachten. Die während der Durchführung dieser Studie verwendeten Methoden und gewonnenen Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

Eine Übersicht der wichtigsten im Folgenden zitierten Studien zum Zusammenhang zwischen niedrig-dosierter Allergenbelastung und dem Auftreten klinischer Symptome zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Studien zum Zusammenhang zwischen niedrig-dosierter Allergenbelastung und dem Auftreten klinischer Symptome

Studie	Autor	Anzahl der untersuchten Patienten	Inhalierendes Allergen	Dauer	low-dose	Husten	β2-Mimetika Verbrauch	BHR
Comparison of the effects of repetitive low-dose and single-dose antigen challenge on airway inflammation	Liu et al. 2003	8	Beifuß, Hausstaubmilbe, Katze	4 Wochentage (konsekutiv)	25% der PD20	n/a	n/a	n/a
Asymptomatic worsening of airway inflammation during low-dose allergen exposure in asthma: protection by inhaled steroids	de Kluijver et al. 2002	26	Hausstaubmilbe	10 Wochentage (konsekutiv)	5% FEV1-Abfall	Ø	↑	↑
Airway inflammation and altered alveolar macrophage phenotype pattern after repeated low-dose allergen exposure of atopic asthmatic subjects	Lensmar et al. 1999	8	Birke, Gräser	7 Wochentage (konsekutiv)	10% der PD20	↑ 2/8	n/a	↑
Repeated aerosol exposure to small doses of allergen. A model for chronic allergic asthma	Arshad et al. 1998	9	Hausstaubmilbe	12 Tage (3 Tage pro Woche)	0,4 ng	↑ 6/9	↑	↑ 7/9
No signs of activity markers in peripheral blood despite increased bronchial reactivity after repeated low-dose allergen exposure.	Roquet et al. 1998	14	n/a	7 Tage (konsekutiv)	n/a	Ø	Ø	↑
Increases in airway eosinophils and interleukin-5 with minimal bronchoconstriction during repeated low-dose allergen challenge in atopic asthmatics	Sulakvelidze et al. 1998	8	Beifuß, Hausstaubmilbe, Katze	5 Wochentage (konsekutiv)	5% FEV1-Abfall	↑	↑	↑
Effect of natural allergen exposure during the grass pollen season on airways inflammatory cells and asthma symptoms	Djukanovic et al. 1996	17	Gräser (natürliche Exposition)	--	natürliche Exposition	↑ 15/17	↑ 15/17	↑ 15/17
Eigene Daten		23	Hausstaubmilbe	10 Wochentage (konsekutiv)	5% FEV ₁ -Abfall	↑ 4/23	Ø	↑ n.s.

↑: angestiegen; Ø: unverändert; n/a: nicht angegeben; n/s: nicht signifikant

In der Mehrzahl der Fälle (19 von 23) kam es bei unseren Patienten zu keinen klinischen Symptomen. Dies stand im Einklang mit dem ursprünglichen Vorhaben, lediglich subklinische Dosen des Allergens zu applizieren und ein sicheres Modell der Induktion bronchialer Inflammation zu etablieren. Lensmar *et al.* [27] konnten ebenfalls in einem Modell niedrig-dosierter Allergenbelastungen bei 6 von 8 untersuchten Patienten keine Symptome feststellen. Die dabei eingesetzte Dosis entsprach dem zehnten Teil der Dosis, die in einer vorangegangenen Allergenprovokation einen zwanzigprozentigen Abfall der Einsekundenkapazität hervorgerufen hatte (10% der PD₂₀).

Vier von 23 Patienten (alle Placebogruppe) berichteten jedoch über Husten, drei davon während der Phase der niedrig-dosierten Allergenbelastungen. Im Vergleich zum Restkollektiv erhielten diese Patienten sowohl während der Screening-Visite als auch während der Phase der niedrig-dosierten Allergenbelastungen eine deutlich höhere Allergendosis. Aufgrund der hohen Variabilität der eingesetzten Dosen ergaben sich hierbei weder für die Screening-Dosis ($p = 0,05$), noch für die Dosis der niedrig-dosierten Allergenbelastungen ($p = 0,10$) signifikante Werte.

De Kluijver *et al.* [13] untersuchten 26 Patienten, die analog zu vorliegender Studie an zehn aufeinander folgenden Werktagen niedrig-dosierte Allergenbelastungen erhielten. Die Patienten waren in zwei Gruppen randomisiert, von denen eine Gruppe über drei Wochen einmal täglich 400 µg Budesonid inhalierte, während die andere Gruppe ein Placebo einnahm. Über den gesamten Studienzeitraum konnten de Kluijver *et al.* [13] keine signifikante Verschlechterung der Symptome feststellen. Weder innerhalb, noch zwischen den Gruppen war das Auftreten von Symptomen signifikant unterschiedlich. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen konnten de Kluijver *et al.* [13] beim Gebrauch von β_2 -Agonisten feststellen. Diese Beobachtungen decken sich grundsätzlich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, wenngleich hierbei kein signifikanter Unterschied beim Gebrauch kurzwirksamer β_2 -Agonisten vorlag. Diese abweichende Feststellung überrascht jedoch nicht, da anders als in vorliegender Studie ein hochpotentes Steroid eingesetzt wurde. Desto mehr unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse die gute Verträglichkeit niedrig-dosierter Allergenbelastungen und die sichere

Durchführbarkeit, ohne gleichzeitig eine signifikante Verschlechterung der Symptome hervorzurufen.

Arshad *et al.* [4] beobachteten ähnlich wie de Kluijver *et al.* [13], dass deren Patienten am Ende der Studienphase der niedrig-dosierten Allergenbelastungen einen gering, jedoch signifikant erhöhten Gebrauch an inhalativen Bronchodilatoren aufwiesen. Dies war bei unseren Patienten nicht der Fall. Möglicherweise lässt sich dies mit der längeren Dauer der niedrig-dosierten Allergenbelastungen erklären (4 Wochen à 3x im Gegensatz zu 2 Wochen à 5x). Arshad *et al.* [4] versuchten ebenfalls anhand experimenteller Bedingungen die natürliche Allergenbelastung zu imitieren. Das verwendete Allergen war ebenso Hausstaubmilbenallergen. Über einen Zeitraum von vier Wochen inhalierten die Patienten drei Mal pro Woche eine niedrige Dosis des Allergens. Es ergab sich eine erhöhte bronchiale Hyperreagibilität und eine verminderte Lungenfunktion bei milden Asthmatikern. Die verwendete Dosis richtete sich dabei nach der geschätzten Allergenkonzentration in der Umgebungsluft und wurde mit täglich 0,4 ng festgelegt. Somit fand der individuelle Grad der Sensibilisierung der einzelnen Patienten bei diesen Untersuchungen keine Berücksichtigung. Die verwendete Provokationsdosis war gegenüber den in vorliegender Studie eingesetzten Provokationsdosen (siehe Tabelle 1) vergleichsweise gering.

Roquet *et al.* [45] untersuchten in zwei Gruppen 14 Patienten mit allergischem Asthma und führten bei der einen Gruppe über sieben aufeinander folgende Tage eine niedrig-dosierte Allergenbelastung durch. Im Vergleich zur Placebogruppe konnten Roquet *et al.* [45] zwar ebenso wie Arshad *et al.* [4] eine signifikant gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität feststellen, jedoch keinerlei klinische Symptome. Die von Roquet *et al.* [45] beschriebene signifikant gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität bezieht sich auf den Vergleich zwischen der Gruppe, die mit niedrig-dosiertem Allergen belastet wurden und der Placebogruppe, die überhaupt nicht belastet wurde. In vorliegender Studie wurden jedoch beide Gruppen mit niedrig-dosiertem Allergen belastet.

Djukanovic *et al.* [14] untersuchten 17 Graspollen-sensible Asthmatiker vor und während der Hauptsaison des Aeroallergens. Sie konnten zeigen, dass durch die

natürliche Allergenexposition neben einer Entzündungsantwort unter Eosinophilen-, Mastzell- und T-Zellbeteiligung auch eine gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität induziert wird. Die Untersuchungen fanden jedoch unter natürlicher Allergenexposition statt und damit ohne nachvollziehbare Konzentration des Allergens, dem die Patienten ausgesetzt waren. Darüber hinaus erlitten 15 der untersuchten Patienten eine Asthma-Exazerbation während des Untersuchungszeitraumes, zurückzuführen auf den Anstieg der Pollenexposition.

Im Gegensatz zu Djukanovic *et al.* [14] wurde in vorliegender Studie versucht lediglich subklinische Dosen des Allergens zu applizieren; die jeweils applizierten Dosen waren standardisiert und reproduzierbar. Darüber hinaus wurde anders als von Djukanovic *et al.* [14] nicht Graspollen verwendet, sondern Hausstaubmilbenallergen.

Bei unseren Patienten fand sich ebenfalls eine deutlich gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität nach niedrig-dosierter Allergenbelastung. Die PD₂₀ war bei der Abschlussvisite V12 (geometrisches Mittel: 0,39 mg ± 0,15) bei Betrachtung aller Patienten gemittelt 35,1% niedriger als bei Visite 1 (geometrisches Mittel: 0,59 mg ± 0,18). Die Patienten beider Gruppen wiesen im Vergleich zum Studienbeginn eine deutlich gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität auf, die jedoch aufgrund der sehr großen Variabilität zu keinem Zeitpunkt signifikant war ($p > 0,1$).

Bei der Wahl der passenden Dosis für die niedrig-dosierten Allergenbelastungen waren zwei Kriterien ausschlaggebend. Einerseits sollte die Dosis signifikant niedriger sein, als bei einer konventionellen Allergenprovokation. Andererseits sollte die Dosis hoch genug sein, um eine kleine, jedoch messbare Änderung der FEV₁ hervorzurufen. Dies wiederum diente der Sicherstellung, dass der Patient tatsächlich auf das Allergen reagiert [51]. Die nicht-kumulative Dosis, die einen fünfprozentigen Abfall der Einsekundenkapazität während einer Screening-Hochdosis-Allergenprovokation hervorrief, erfüllte beide Kriterien und schien daher die optimale Dosis des Allergens zu sein. De Kluijver *et al.* [13] belasteten 26 Patienten über einen Zeitraum von zwei Wochen mit dieser Dosis und erhielten keine signifikante Verschlechterung der klinischen Symptome. Aufgrund der ganzjährigen Exposition gegenüber Hausstaubmilbenallergen war es unmöglich die Patienten außerhalb der Allergen-Saison bronchial zu provozieren. Die niedrig-dosierte Allergenbelastung

wurde als zusätzlicher Entzündungsreiz betrachtet, in dem Bewusstsein, dass der vollständige Ausschluss konkurrierender Einflüsse durch anderweitige Exposition unmöglich ist.

Der während der niedrig-dosierten Allergenprovokationen erwünschte regelmäßige mittlere FEV₁-Abfall in Höhe von jeweils fünf Prozent wurde annähernd erzielt (siehe Abb.5) und lag im Mittel bei 5,93% ($\pm 2,14$) in der Verum- und 5,46% ($\pm 1,75$) in der Placebo-Gruppe. Die jeweils applizierte Dosis (siehe Tabelle 5) errechnete sich als arithmetisches Mittel aus den beiden Dosisstufen der spezifischen Screening-Provokation, zwischen denen es zu einem fünfprozentigen Abfall der Einsekundenkapazität (FEV₁) kam. Da jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen der applizierten Dosis und dem Abfall der Einsekundenkapazität besteht, ist diese Form der Ermittlung der Dosis als unzureichend und bestenfalls als Annäherung an die tatsächliche Dosis zu betrachten. Aufgrund der Tatsache, dass es sich hierbei um einen systematischen Fehler handelte, waren zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im FEV₁-Abfall zwischen den Gruppen feststellbar.

Der maximale FEV₁-Abfall innerhalb 30 Minuten nach niedrig-dosierter Allergenbelastung variierte sowohl individuell als auch interindividuell sehr stark, so dass bei manchen Visiten das Ziel einer subklinischen Belastung verfehlt wurde. Betrachtet man lediglich die Werte, die einen maximalen FEV₁-Abfall < 20% wiedergeben, so lag der maximale mittlere FEV₁-Abfall bei 10,11 % ($\pm 1,92$) in der Verumgruppe und 9,63% ($\pm 2,08$) in der Placebogruppe (Tabelle 5). An diesem Punkt lässt sich ansetzen bei der Planung und Durchführung zukünftiger Studien mit niedrig-dosierter Allergenbelastung. Räumt man den systematischen Fehler aus, so dürften die angepeilten fünfprozentigen FEV₁-Abfälle noch besser und zuverlässiger zu erzielen sein.

Exhalierendes NO ist ein Marker, der die bronchiale Atemwegsentzündung bei allergischen Asthmatikern gut reflektiert. Diese von Eosinophilen getragene Atemwegsentzündung wird für gewöhnlich damit assoziiert auf Steroide gut anzusprechen. Daher können eNO-Konzentrationen zur Überwachung des therapeutischen Nutzens von Steroidbehandlungen oder anderen anti-inflammatorischen Therapien genutzt werden [29].

Aufgrund einer vermehrten Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Zellen des Respirationstraktes bei allergischem Asthma bronchiale [25, 30, 43] steigen die eNO-Werte an, wenn das Asthma nach Allergenexposition instabil wird, und sie fallen ab durch antientzündliche Therapie. Darüber hinaus sind die eNO-Werte beim Fehlen einer eosinophilen Atemwegsentzündung meist niedrig [53].

Das exhalierete NO (eNO) stieg bei allen Patienten im Verlauf der beiden Wochen niedrig-dosierter Allergenbelastungen deutlich an. Im Vergleich zur Placebogruppe war der Anstieg in der *n*-3 PUFA-Gruppe jedoch signifikant geringer ($p < 0,05$ bei Visite 6 und Visite 7). Daraus ergibt sich, dass bei allen Patienten durch die niedrig-dosierten Allergenbelastungen die bronchiale Entzündung verstärkt und für die Dauer der Belastungen unterhalten wurde. Sehr deutlich spiegelte sich dies in den eNO-Werten nach den belastungsfreien Wochenendtagen wieder, die gemittelt 26,5% ($\pm 2,7$) niedriger waren als vor dem belastungsfreien Wochenende. Über den gesamten Belastungszeitraum betrachtet, war die Ausprägung der Entzündung im Hinblick auf die eNO-Werte in der Verumgruppe deutlich geringer.

Der beeindruckende Effekt auf das eNO steht im Gegensatz zu der geringfügigen Wirkung auf die bronchiale Hyperreagibilität. Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren von Allergen-aktivierten Mastzellen kann sowohl zu einem Anstieg des eNO beitragen als auch zu einer Allergen-induzierten Atemwegshyperreagibilität. Eine Allergen-induzierte Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Mastzellen kann bis zu einem gewissen Grad durch *n*-3 PUFA gehemmt, jedoch nicht komplett verhindert werden.

Der antientzündliche Effekt von *n*-3 PUFA, der sich in der ersten Woche der niedrig-dosierten Allergenbelastungen deutlich bemerkbar machte, war in der zweiten Woche nahezu verschwunden. Dies hing jedoch nicht etwa mit einem Versagen der *n*-3 PUFA Supplementierung aufgrund von Non-Compliance der Patienten zusammen. Die diätetische Compliance der Patienten wurde mittels Fettsäuremusteranalysen des Plasmas verifiziert. Interessanterweise verursachte bereits eine *n*-3 PUFA Supplementierung von etwa 0,5 g pro Tag eine vierfach erhöhte EPA-Plasmakonzentration bei Patienten der Verumgruppe im Vergleich zur

Placebogruppe. Daher erscheint eine potentere antientzündliche Behandlung (z.B. mit Kortikosteroiden) notwendig zu sein, um die Entwicklung einer Allergen-induzierten bronchialen Hyperreagibilität effektiv verhindern zu können. Die Diskrepanz zwischen Atemwegsentzündung und Allergen-induzierter Atemwegshyperreagibilität wurde kürzlich beschrieben im Zusammenhang mit der medikamentösen Behandlung mit verschiedenen Dosen eines inhalativen Steroids. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die einmal tägliche Inhalation von 100 µg Budesonid als auch von 400 µg Budesonid die Allergen-induzierte Sputumeosinophilie signifikant reduzieren kann. Jedoch konnte lediglich die höhere Dosis die Allergen-induzierte Atemwegsreagibilität abschwächen [19].

In Bezug auf die klinische Symptomatik, die bronchiale Hyperreagibilität und die Einsekundenkapazität waren keine signifikanten Unterschiede der Verumgruppe gegenüber der Placebogruppe feststellbar. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien [5, 52]. Woods *et al.* [56] kamen nach einer Recherche des Registers der Cochrane Airways Review Group zu der Schlussfolgerung, dass es keine ausreichende Evidenz gibt, dass *n*-3 PUFA die Symptomatik bei Patienten mit Asthma bronchiale verbessert. Untersucht wurden neun randomisierte und kontrollierte Studien [1, 15, 24, 35, 48, 54], welche die Supplementierung von *n*-3 PUFA gegenüber Placebo oder *n*-6 PUFA [21] verglichen. Sieben der Studien wurden an Erwachsenen durchgeführt, zwei an Kindern [21, 35].

Seit Veröffentlichung der Untersuchungen von Woods *et al.* [56] wurden jedoch weitere Studien zu diesem Thema veröffentlicht, die an dieser Stelle erwähnt werden sollen. Die Childhood Asthma Prevention Group [41] berichtete, dass eine diätetische Nahrungsergänzung mit täglich etwa 184mg *n*-3 Fettsäuren zu einer signifikanten Reduktion von Husten bei atopischen Kindern führt, wenngleich die allergische Sensibilisierung nicht beeinflusst wird. Die Autoren führen die unter *n*-3 Fettsäuresupplementierung reduzierte Hustenneigung bei atopischen Erkrankungen auf eine verminderte Produktion von Entzündungsmediatoren zurück, die sich von der Arachidonsäure ableiten [50].

Mickleborough *et al.* [32] konnten in einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigen, dass die Supplementierung mit Fischöl einen protektiven Effekt bei

Anstrengungsasthma haben kann und somit eine nicht-pharmakologische Intervention mit EPA und DHA potentiell von Vorteil sein könnte. Darüber fand dieselbe Gruppe heraus, dass *n*-3 PUFA bei nicht-atopischen Eliteathleten mit Anstrengungsasthma eine Engstellung der Atemwege, Medikamentengebrauch und die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren vermindern kann [33]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die diätetische Supplementierung mit Fischöl möglicherweise eine funktionierende Behandlungsoption bzw. Begleittherapie bei Asthma bronchiale und Anstrengungsasthma darstellen könnte.

Es ist eine laufende Debatte, ob höhere als in vorliegender Studie applizierte Dosen *n*-3 PUFA möglicherweise einen größeren anti-entzündlichen Effekt zeigen können. Der tägliche Einsatz von mindestens drei Gramm omega-3 Fettsäuren, welches als hohe Erwachsenenendosis betrachtet wird, wurde in vielen Studien angewendet, ohne jedoch überzeugende Ergebnisse zu liefern, dass solch eine Dosis einer niedrig-dosierten Supplementierung überlegen wäre [2, 24, 54].

Theoretisch ist die unmittelbarste Folge einer *n*-3 PUFA Einnahme eine Veränderung der Fettsäuremuster im Gewebe. Die Messung und Interpretation des Effektes von *n*-3 PUFA wird jedoch verkompliziert durch die Gewebeverteilung, Stichprobengröße, Art und Dosis der *n*-3 PUFA und durch die Heterogenität von Asthmapatienten (klinisches Erscheinungsbild, inklusive der Asthmaschwere oder auch auslösende Faktoren mit dem Potential das Asthma kontrollieren zu können). Nichts desto trotz waren die Ergebnisse zweier Studien, die eine niedrige Dosis verwendet haben, sehr viel versprechend. Nagakura *et al.* [35] fanden im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion des Asthma Symptom Score und der bronchialen Hyperreagibilität bei Kindern, hervorgerufen durch eine zehnmonatige Einnahme von 120 mg *n*-3 PUFA pro Tag. Darüber hinaus wurde kürzlich ein Lipidextrakt der neuseeländischen Grünlippenmuschel (New Zealand green-lipped mussel) mit einem Gehalt von 100 mg *n*-3 PUFA in 46 Patienten mit atopischem Asthma bronchiale untersucht. Verglichen mit der Placebogruppe ergaben sich in der Lipidextraktgruppe eine signifikante Minderung von Giemen tagsüber und eine Zunahme des morgendlichen PEF [16].

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass wiederholte niedrig-dosierte Allergenbelastungen ohne Probleme durchführbar sind und dennoch Zeichen bronchialer Entzündung (Anstieg des eNO) hervorrufen können. Eine kumulative Wirkung niedrig-dosierter Allergenbelastungen auf die bronchiale Entzündung konnte durch Verlaufsbestimmung des eNO und die gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität gezeigt werden. Das Fehlen klinischer Symptome bei der Mehrzahl der Patienten zeigte, dass ein leichtgradiges Asthma bronchiale klinisch stumm verlaufen kann und die bronchiale Entzündung dennoch permanent durch repetitive Allergenbelastung unterhalten wird. Es konnte keinerlei Korrelation zwischen der Konzentration des spezifischen IgE und einem anderen Messparameter (eNO, FEV₁, PD₂₀, Screening-Allergendosis) nachgewiesen werden.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Modell niedrig-dosierter Allergenbelastungen bei Patienten mit leichtem Asthma bronchiale sicher durchführbar und gut verträglich ist. Darüber hinaus lieferte vorliegende Arbeit weitere Hinweise, dass eine fünfwöchige diätetische Supplementierung mit 0,8 g mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*n*-3 PUFA) pro Tag eine antientzündliche Wirkung bei allergischen Asthmatikern besitzt und die bronchiale Entzündung reduzieren kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen hoffen, dass in zukünftigen Studien das Modell niedrig-dosierter Allergenbelastungen weitere Beiträge leisten kann zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bei allergischen Asthmatikern.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchführung, Sicherheit und Verträglichkeit wiederholter niedrig-dosierter Allergenbelastungen im bronchialen Provokationsmodell bei leichten allergischen Asthmatikern untersucht. Die klinischen Symptome, die Lungenfunktion und bronchiale Hyperreagibilität wurden vor, während und nach der Belastung gemessen. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit eine Diät reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren einen protektiven Effekt auf die Entzündung und Symptomatik bei Asthmatikern haben kann.

Die vorliegende Studie sollte folgende Fragen klären:

- Ist eine wiederholte niedrig-dosierte Allergenbelastung sicher?
- Kommt es zu klinischen Symptomen und einem FEV₁-Abfall?
- Haben *n*-3 PUFA einen protektiven Effekt auf die klinischen Symptome bei Hausstaubmilbenallergikern mit leichtem Asthma bronchiale?
- Verstärkt wiederholte niedrig-dosierte Allergenbelastung die bronchiale Hyperreagibilität? Und wenn ja, wie stark ist der Einfluss von *n*-3 PUFA?

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden insgesamt 30 junge Erwachsene in die Studie eingeschlossen (16 Frauen, 14 Männer, mittleres Alter 24,0 ± 2,1 Jahre). Die Patienten wurden in zwei Gruppen randomisiert: Gruppe A entsprach der Verumgruppe (*n*-3 PUFA-Mischung angereichert mit EPA 450 mg/Tag, DHA 180 mg/Tag, GLA 60 mg/Tag und STA 60 mg/Tag; n=15), Gruppe B entsprach der Placebogruppe (Fettsäuremischung bestehend aus gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren, n=15). Insgesamt wurden die Patienten über einen Zeitraum von fünf Wochen mit der jeweiligen Fettsäuremischung supplementiert. In den letzten beiden Wochen der Einnahme wurde werktags täglich mit einer errechneten Dosis (FEV₁-Abfall um 5%) an Hausstaubmilbenallergen (*Dermatophagoides farinae* bzw. *Dermatophagoides pteronyssinus*) eine bronchiale Provokation durchgeführt. Aufgrund eines unzureichenden Anstiegs des exhalieren NO (eNO) im Laufe der ersten Woche der niedrig-dosierten Allergenbelastungen (eNO < 30ppb) wurden sieben Patienten aus der Studie ausgeschlossen (vier männliche und drei weibliche Patienten; vier aus der Placebo- und drei aus der Verumgruppe). Diese Patienten

wurden als Non-Responder auf den applizierten Entzündungsreiz betrachtet und werden in den nachfolgenden Statistiken nicht berücksichtigt.

Die niedrig-dosierte Allergenbelastung wurde von allen Patienten gut vertragen. Während des gesamten Studienzeitraumes berichteten lediglich vier Patienten der Placebogruppe an manchen Studientagen über Husten, drei dieser Patienten hatten diese Beschwerden während der Phase der niedrig-dosierten Allergenbelastungen. Sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe war der Gebrauch kurzwirksamer β_2 -Agonisten während der beiden Wochen niedrig-dosierter Allergenbelastungen dementsprechend sehr gering. Beide Gruppen wiesen über den gesamten Studienzeitraum weder innerhalb noch zwischen den Gruppen signifikant unterschiedliche mittlere FEV₁-Basiswerte (Maßeinheit Liter \pm SEM: Verumgruppe: $4,27 \pm 0,26$; Placebogruppe: $4,24 \pm 0,23$) oder eine signifikant gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität ($p > 0,4$) auf. Der maximale mittlere FEV₁-Abfall (\pm SEM) innerhalb 30 Minuten nach niedrig-dosierter Allergenbelastung lag bei 10,11 % ($\pm 1,92$) in der Verum- und 9,63% ($\pm 2,08$) in der Placebogruppe und war zu keinem Zeitpunkt signifikant zwischen den Gruppen. Der während der niedrig-dosierten Allergenprovokationen erwünschte regelmäßige mittlere FEV₁-Abfall in Höhe von jeweils fünf Prozent wurde weder in der Verum- noch in der Placebogruppe erzielt, sondern lag im Mittel bei 5,93% ($\pm 2,14$) in der Verum- und 5,46% ($\pm 1,75$) in der Placebogruppe. In beiden Gruppen stieg das exhalierete NO (eNO) während der Phase der niedrig-dosierten Allergenbelastungen signifikant. In der Verumgruppe war diese Erhöhung jedoch geringer ausgeprägt und die eNO-Werte (\pm SEM) waren über den gesamten Studienzeitraum niedriger. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren signifikant bei Visite 6 (Verumgruppe: $91,27$ ppb $\pm 16,72$; Placebogruppe: $153,73$ ppb $\pm 21,05$; $p < 0,05$) und Visite 7 (Verumgruppe: $68,07$ ppb $\pm 11,35$; Placebogruppe: $117,44$ ppb $\pm 18,84$; $p < 0,05$).

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass wiederholte niedrig-dosierte Allergenbelastungen ohne Probleme durchführbar sind und dennoch Zeichen bronchialer Entzündung (Anstieg des eNO) hervorrufen können. Das Fehlen klinischer Symptome bei der Mehrzahl der Patienten zeigte, dass ein leichtgradiges Asthma bronchiale klinisch stumm verlaufen kann und die bronchiale Entzündung dennoch permanent durch repetitive Allergenbelastung unterhalten wird. Darüber hinaus lieferte vorliegende Arbeit weitere Hinweise, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*n*-3 PUFA) eine antientzündliche Wirkung besitzen.

6 Summary

The present study examined the process, safety and tolerance of repetitive low dose allergen challenge in a bronchial provocation model in patients suffering from mild allergic asthma. The clinical symptoms, lung function and bronchial hyperreactivity were measured before, during and after the low dose challenge. Moreover, the present study tried to figure out a possible protective effect of a diet rich in polyunsaturated fatty acids on airway inflammation and symptoms in asthmatic patients.

The present study should provide answers to the following questions:

- Is repetitive low dose allergen challenge safe?
- Does it cause clinical symptoms and a fall in FEV₁?
- Do *n*-3 PUFA have a protective effect on clinical symptoms within patients suffering from dust mite allergy and mild asthma?
- Does repetitive low dose allergen challenge increase bronchial hyperreactivity? And if yes, how strong is the effect of *n*-3 PUFA?

To clarify these questions we included a total of 30 young adults in our study (w: 16, m: 14; mean age 24.0 ± 2.1 years). Patients were randomized into two groups: group A receiving PUFA (*n*-3 PUFA blend rich in EPA 450 mg/day, DHA 180 mg/day, GLA 60 mg/day and STA 60 mg/day; n=15), group B receiving a placebo (fat blend mainly consisting of olive oil, n=15). As a whole our patients were supplemented with their fat blend over a period of five weeks. Over the last two weeks of supplementation we daily challenged our patients' airways with a calculated low dose (leading to a five percent fall in FEV₁) of dust mite allergen (*Dermatophagoides farinae* or *Dermatophagoides pteronyssinus*). Due to an insufficient rise of the fraction of exhaled nitric oxide (eNO) during the first week of low dose allergen challenge (eNO < 30 ppb), seven patients were excluded from the study (four male and three female patients; four out of the placebo group and three out of the PUFA group). These patients were considered non-responders to our inducer of inflammation and are not included in the following statistics.

The low dose allergen challenge was well tolerated by all of our patients. Throughout the whole study, only four patients out of the placebo group reported complaints in the form of coughing on several study days. Three of these patients also reported having these complaints during the period of low dose challenges. Thus the usage of short-acting β_2 -agonists was very low in the PUFA group as well as the placebo group. Both groups did not show a significant difference of mean baseline FEV₁ neither between nor within the groups (liter \pm SEM: PUFA: 4.27 \pm 0.26; placebo: 4.24 \pm 0.23). Bronchial hyperreactivity increased after allergen challenge in both groups but failed to reach significance ($p > 0.4$). The maximal mean fall in FEV₁ (\pm SEM) within 30 minutes after the low dose challenge was 10.11 % (\pm 1.92) and 9.63% (\pm 2.08) in the PUFA and placebo group respectively; it did not show a significant difference between the groups at any time over the study period. The targeted periodical five percent mean fall in FEV₁ during the low dose challenge could be achieved neither in the PUFA nor in the placebo group. The mean fall in FEV₁ rather was 5.93% (\pm 2.14) and 5.46% (\pm 1.75) in the PUFA and placebo group respectively. Exhaled NO (eNO) significantly increased during low-dose allergen exposure in both groups, but was constantly lower in the n-3 PUFA group. Between group comparison showed significant differences at visit 6 (PUFA: 91.27 ppb \pm 16.72; placebo: 153.73 ppb \pm 21.05; $p < 0.05$) and visit 7 (PUFA: 68.07 ppb \pm 11.35; placebo: 117.44 ppb \pm 18.84; $p < 0.05$).

In the present study we could show that repetitive low dose allergen challenge can be performed unproblematic while still promoting airway inflammation (rise in eNO). The absence of clinical symptoms in most of our patients showed that mild asthma can remain silent while the airway inflammation remains permanently active through repetitive low dose allergen challenge. Moreover, the present study delivered further information on polyunsaturated fatty acids (*n*-3 PUFA) having anti-inflammatory effects.

7 *Literaturverzeichnis*

- (1) **Arm JP, Horton CE, Mencia-Huerta JM, House F, Eiser NM, Clark TJ et al.** Effect of dietary supplementation with fish oil lipids on mild asthma. *Thorax* 1988; 43(2):84-92.
- (2) **Arm JP, Horton CE, Spur BW, Mencia-Huerta JM, Lee TH.** The effects of dietary supplementation with fish oil lipids on the airways response to inhaled allergen in bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(6):1395-1400.
- (3) **Arshad SH.** Bronchial allergen challenge: a model for chronic allergic asthma? *Clin Exp Allergy* 2000; 30(1):12-15.
- (4) **Arshad SH, Hamilton RG, Adkinson NF, Jr.** Repeated aerosol exposure to small doses of allergen. A model for chronic allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(6 Pt 1):1900-1906.
- (5) **Bolte G, Kompauer I, Fobker M, Cullen P, Keil U, Mutius E et al.** Fatty acids in serum cholesteryl esters in relation to asthma and lung function in children. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(3):293-302.
- (6) **Boulay ME, Boulet LP.** Lower airway inflammatory responses to repeated very-low-dose allergen challenge in allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(10):1441-1447.
- (7) **Broadfield EC, McKeever TM, Whitehurst A, Lewis SA, Lawson N, Britton J et al.** A case-control study of dietary and erythrocyte membrane fatty acids in asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(8):1232-1236.
- (8) **Broughton KS, Johnson CS, Pace BK, Liebman M, Kleppinger KM.** Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(4):1011-1017.
- (9) **Calabresi L, Villa B, Canavesi M, Sirtori CR, James RW, Bernini F et al.** An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 2004; 53(2):153-158.
- (10) **Calder PC.** Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 2002; 61(3):345-358.
- (11) **Connell JT.** Quantitative intranasal pollen challenges. 3. The priming effect in allergic rhinitis. *J Allergy* 1969; 43(1):33-44.
- (12) **de Gouw HW, Grunberg K, Schot R, Kroes AC, Dick EC, Sterk PJ.** Relationship between exhaled nitric oxide and airway hyperresponsiveness following experimental rhinovirus infection in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1998; 11(1):126-132.

- (13) **de Kluijver J, Evertse CE, Schrumpf JA, van d, V, Zwinderman AH, Hiemstra PS et al.** Asymptomatic worsening of airway inflammation during low-dose allergen exposure in asthma: protection by inhaled steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(3):294-300.
- (14) **Djukanovic R, Feather I, Gratziou C, Walls A, Peroni D, Bradding P et al.** Effect of natural allergen exposure during the grass pollen season on airways inflammatory cells and asthma symptoms. *Thorax* 1996; 51(6):575-581.
- (15) **Dry J, Vincent D.** Effect of a fish oil diet on asthma: results of a 1-year double-blind study. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 95(2-3):156-157.
- (16) **Emelyanov A, Fedoseev G, Krasnoschekova O, Abulimity A, Trendeleva T, Barnes PJ.** Treatment of asthma with lipid extract of New Zealand green-lipped mussel: a randomised clinical trial. *Eur Respir J* 2002; 20(3):596-600.
- (17) **Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW et al.** The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 1989; 320(5):265-271.
- (18) **Frolund L, Madsen F, Scharling B, Heinig JH, Svendsen UG.** Bronchial allergen challenge: dose versus concentration. *Clin Exp Allergy* 1992; 22(2):219-225.
- (19) **Gauvreau GM, Sulakvelidze I, Watson RM, Inman MD, Rerecich TJ, O'Byrne PM.** Effects of once daily dosing with inhaled budesonide on airway hyperresponsiveness and airway inflammation following repeated low-dose allergen challenge in atopic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(9):1235-1243.
- (20) **Grynberg A.** Hypertension prevention: from nutrients to (fortified) foods to dietary patterns. Focus on fatty acids. *J Hum Hypertens* 2005; 19 Suppl 3:S25-S33.
- (21) **Hodge L, Salome CM, Hughes JM, Liu-Brennan D, Rimmer J, Allman M et al.** Effect of dietary intake of omega-3 and omega-6 fatty acids on severity of asthma in children. *Eur Respir J* 1998; 11(2):361-365.
- (22) **Horrobin DF.** Low prevalences of coronary heart disease (CHD), psoriasis, asthma and rheumatoid arthritis in Eskimos: are they caused by high dietary intake of eicosapentaenoic acid (EPA), a genetic variation of essential fatty acid (EFA) metabolism or a combination of both? *Med Hypotheses* 1987; 22(4):421-428.
- (23) **Ihre E, Axelsson IG, Zetterstrom O.** Late asthmatic reactions and bronchial variability after challenge with low doses of allergen. *Clin Allergy* 1988; 18(6):557-567.

- (24) **Kirsch CM, Payan DG, Wong MY, Dohlman JG, Blake VA, Petri MA et al.** Effect of eicosapentaenoic acid in asthma. *Clin Allergy* 1988; 18(2):177-187.
- (25) **Kline JN, Cowden JD, Hunninghake GW, Schutte BC, Watt JL, Wohlford-Lenane CL et al.** Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(1):297-303.
- (26) **Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, III, Spur BW et al.** Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med* 1985; 312(19):1217-1224.
- (27) **Lensmar C, Prieto J, Dahlen B, Eklund A, Grunewald J, Roquet A.** Airway inflammation and altered alveolar macrophage phenotype pattern after repeated low-dose allergen exposure of atopic asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(12):1632-1640.
- (28) **Liu LY, Swenson CA, Kelly EA, Kita H, Jarjour NN, Busse WW.** Comparison of the effects of repetitive low-dose and single-dose antigen challenge on airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(4):818-825.
- (29) **Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM.** Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(2):800-803.
- (30) **Michel O, Nagy AM, Schroeven M, Duchateau J, Neve J, Fondu P et al.** Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(4 Pt 1):1157-1164.
- (31) **Mickleborough TD.** Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and airway hyperresponsiveness in asthma. *J Asthma* 2005; 42(5):305-314.
- (32) **Mickleborough TD, Lindley MR, Ionescu AA, Fly AD.** Protective effect of fish oil supplementation on exercise-induced bronchoconstriction in asthma. *Chest* 2006; 129(1):39-49.
- (33) **Mickleborough TD, Murray RL, Ionescu AA, Lindley MR.** Fish oil supplementation reduces severity of exercise-induced bronchoconstriction in elite athletes. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(10):1181-1189.
- (34) **Mori TA, Bao DQ, Burke V, Puddey IB, Beilin LJ.** Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension* 1999; 34(2):253-260.
- (35) **Nagakura T, Matsuda S, Shichijyo K, Sugimoto H, Hata K.** Dietary supplementation with fish oil rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids in children with bronchial asthma. *Eur Respir J* 2000; 16(5):861-865.

- (36) **National Heart, Lung and Blood Institute.** Global Initiative for Asthma (GINA): Pocket Guide for Asthma Management and Prevention. NIH Publication No. 02-3659. Bethesda, MD: *National Institutes of Health / National Heart, Lung and Blood Institute.* 2002.
- (37) **O'Byrne PM, Dolovich J, Hargreave FE.** Late asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136(3):740-751.
- (38) **Obata T, Nagakura T, Masaki T, Maekawa K, Yamashita K.** Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D2 generation by inhibiting cyclo-oxygenase-2 in cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(8):1129-1135.
- (39) **Okamoto M, Mitsunobu F, Ashida K, Mifune T, Hosaki Y, Tsugeno H et al.** Effects of dietary supplementation with n-3 fatty acids compared with n-6 fatty acids on bronchial asthma. *Intern Med* 2000; 39(2):107-111.
- (40) **Payan DG, Wong MY, Chernov-Rogan T, Valone FH, Pickett WC, Blake VA et al.** Alterations in human leukocyte function induced by ingestion of eicosapentaenoic acid. *J Clin Immunol* 1986; 6(5):402-410.
- (41) **Peat JK, Miharshahi S, Kemp AS, Marks GB, Tovey ER, Webb K et al.** Three-year outcomes of dietary fatty acid modification and house dust mite reduction in the Childhood Asthma Prevention Study. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(4):807-813.
- (42) Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(6):2104-2117.
- (43) **Redington AE, Meng QH, Springall DR, Evans TJ, Creminon C, Maclouf J et al.** Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax* 2001; 56(5):351-357.
- (44) **Ren H, Magulike N, Ghebremeskel K, Crawford M.** Primary open-angle glaucoma patients have reduced levels of blood docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 74(3):157-163.
- (45) **Roquet A, Lagging E, Ihre E, Hage-Hamsten M, Hallden G, Harfast B et al.** No signs of activity markers in peripheral blood despite increased bronchial reactivity after repeated low-dose allergen exposure. *APMIS* 1998; 106(2):293-299.
- (46) **Skoner DP.** Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(1 Suppl):S2-S8.

- (47) **Spanevello A, Vignola AM, Bonanno A, Confalonieri M, Crimi E, Brusasco V.** Effect of methacholine challenge on cellular composition of sputum induction. *Thorax* 1999; 54(1):37-39.
- (48) **Stenius-Aarniala B, Aro A, Hakulinen A, Ahola I, Seppala E, Vapaatalo H.** Evening primrose oil and fish oil are ineffective as supplementary treatment of bronchial asthma. *Ann Allergy* 1989; 62(6):534-537.
- (49) **Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O'Byrne PM, Anderson SD et al.** Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl* 1993; 16:53-83.
- (50) **Stone R, Barnes PJ, Fuller RW.** Contrasting effects of prostaglandins E2 and F2 alpha on sensitivity of the human cough reflex. *J Appl Physiol* 1992; 73(2):649-653.
- (51) **Sulakvelidze I, Inman MD, Rerecich T, O'Byrne PM.** Increases in airway eosinophils and interleukin-5 with minimal bronchoconstriction during repeated low-dose allergen challenge in atopic asthmatics. *Eur Respir J* 1998; 11(4):821-827.
- (52) **Surette ME, Koumenis IL, Edens MB, Tramposch KM, Clayton B, Bowton D et al.** Inhibition of leukotriene biosynthesis by a novel dietary fatty acid formulation in patients with atopic asthma: a randomized, placebo-controlled, parallel-group, prospective trial. *Clin Ther* 2003; 25(3):972-979.
- (53) **Taylor DR.** Nitric oxide as a clinical guide for asthma management. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(2):259-262.
- (54) **Thien FC, Mencia-Huerta JM, Lee TH.** Dietary fish oil effects on seasonal hay fever and asthma in pollen-sensitive subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(5):1138-1143.
- (55) **Villani F, Comazzi R, De Maria P, Galimberti M.** Effect of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids on bronchial hyperreactivity in subjects with seasonal asthma. *Respiration* 1998; 65(4):265-269.
- (56) **Woods RK, Thien FC, Abramson MJ.** Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;(3):CD001283.

8 Anhang

8.1 Mittlere FEV₁-Basiswerte (in Litern)

Patient	Screening	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
Verumgruppe													
1	3,95	3,92	4,08	4,02	3,89	3,95	4,54	3,92	4,03	3,87	3,61	3,58	3,86
3	5,11	4,93	5,54	5,61	5,38	5,55	5,65	5,18	5,51	5,33	5,4	5,39	5,27
5	4,7	4,29	4,85	4,86	4,96	4,98	4,87	4,13	4,89	4,74	4,91	4,51	5,17
9	3,14	2,84	3,11	3,34	2,97	3,08	3,17	3,3	3,22	3,25	3,21	3,24	3,28
12	4,52	4,58	4,76	4,49	4,66	4,48	4,8	4,2	4,31	4,94	4,65	4,74	4,56
13	5,4	5,02	5,63	5,36	5,4	5,36	5,13	4,62	5,82	4,85	5,88	5,23	5,2
16	3,73	3,8	4,04	3,96	4,07	3,93	3,98	3,49	3,62	3,71	3,71	3,71	3,71
18	3,14	3,32	3,16	3,31	3,17	3,1	3,27	3,29	3,45	3,46	3,54	3,65	3,31
21	3,6	3,58	3,79	3,67	3,57	3,67	3,61	3,16	3,73	3,81	3,79	3,81	3,36
27	4,38	4,07	3,83	4,12	3,95	4,1	3,59	3,93	-	3,65	4,09	3,65	3,79
29	3,84	4,14	3,3	3,58	3,57	3,79	3,64	3,66	3,58	3,5	3,37	3,55	3,54
31	6,2	6,19	5,59	5,98	5,83	5,77	5,83	5,5	5,88	5,56	5,77	5,49	5,61
Anzahl	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12
Mittelwert	4,31	4,22	4,31	4,36	4,29	4,31	4,34	4,03	4,37	4,22	4,33	4,21	4,22
SD	0,93	0,88	0,94	0,91	0,94	0,92	0,92	0,75	0,99	0,80	0,96	0,81	0,88
SEM	0,27	0,25	0,27	0,26	0,27	0,26	0,27	0,22	0,30	0,23	0,28	0,23	0,25
Median	4,17	4,11	4,06	4,07	4,01	4,03	4,26	3,93	4,03	3,84	3,94	3,76	3,83
Placebogruppe													
2	3,54	3,28	3,4	3,23	3,23	3,26	3,49	3,38	3,42	3,63	3,64	3,57	3,64
6	4,33	4,87	4,89	5,41	5,34	5,01	5,3	5,31	5,31	5,63	5,1	5,09	4,99
8	4,78	4,49	4,38	4,82	4,77	4,68	4,8	4,93	5,03	4,88	4,68	5,1	4,7
11	4,51	4,16	4,49	4,63	4,29	4,67	4,49	4,54	4,75	4,78	4,29	4,87	4,78
17	3,73	3,99	4,08	4,18	4,38	4,22	4,1	4,04	3,81	4,36	4,31	4,38	4,29
19	3,89	3,72	4,01	3,9	3,88	3,72	4,19	3,48	3,68	3,86	3,61	3,94	3,9
22	5,45	5,16	5,07	5,45	5,14	5,47	5,68	5,45	5,24	5,69	5,77	5,76	5,69
23	3,91	3,71	3,6	3,86	3,79	3,57	3,65	3,32	3,58	3,78	3,82	3,78	3,79
25	3,35	3,13	4,03	3,78	3,44	3,47	3,45	2,99	2,94	3,26	3,43	3,2	3,21
28	4,12	3,64	3,16	3,44	3,34	3,62	3,21	3,6	3,72	3,36	3,45	3,5	3,6
30	5,2	4,93	4,99	4,89	5,13	4,82	4,66	4,65	4,71	4,75	4,31	4,53	4,65
Anzahl	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Mittelwert	4,26	4,10	4,19	4,33	4,25	4,23	4,27	4,15	4,20	4,36	4,22	4,34	4,29
SD	0,67	0,69	0,64	0,76	0,77	0,74	0,80	0,86	0,82	0,85	0,74	0,81	0,74
SEM	0,20	0,21	0,19	0,23	0,23	0,22	0,24	0,26	0,25	0,26	0,22	0,24	0,22
Median	4,12	3,99	4,08	4,18	4,29	4,22	4,19	4,04	3,81	4,36	4,29	4,38	4,29
T-Test	0,88	0,71	0,74	0,93	0,92	0,81	0,86	0,72	0,67	0,69	0,77	0,71	0,83

8.2 Mittlerer Abfall der FEV₁ (in %)

Patient	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11
Verumgruppe										
1	2,40	17,41	13,11	32,15	12,78	-16,81	27,54	16,28	17,73	9,22
3	-1,13	-0,53	6,13	9,73	29,20	5,21	21,42	9,38	10,00	10,95
5	29,63	29,63	18,35	20,28	11,91	4,03	19,22	37,13	16,29	21,29
9	1,99	6,29	-2,02	3,57	0,32	1,80	1,86	-1,23	6,23	4,94
12	-0,21	-5,79	3,43	-1,79	5,00	5,24	-5,34	-1,21	-1,08	2,53
13	0,62	1,87	3,15	0,75	7,41	-6,10	13,40	2,27	17,69	10,71
16	4,60	18,94	13,51	11,96	8,04	3,19	17,13	1,62	12,13	-0,27
18	-3,24	9,06	5,05	12,26	1,22	-3,48	-0,58	-0,29	5,08	3,29
21	4,17	-2,45	-3,64	5,99	-1,94	5,93	1,07	0,79	1,32	-0,52
27	-0,77	2,43	2,03	-0,98	-3,90	-2,25	-	10,14	4,89	9,86
29	19,73	3,63	5,32	15,04	6,04	11,21	5,59	13,71	15,13	14,93
31	0,54	11,37	21,78	18,20	12,52	14,08	17,01	28,42	15,94	17,30
Anzahl										
	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12
Mittelwert										
	4,86	7,65	7,18	10,60	7,38	1,84	10,76	9,75	10,11	8,68
SD										
	9,75	10,23	7,87	9,98	8,85	8,20	10,68	12,43	6,65	6,93
SEM										
	2,81	2,95	2,27	2,88	2,56	2,37	3,22	3,59	1,92	2,00
Median										
	1,30	4,96	5,18	10,84	6,73	3,61	13,40	5,82	11,06	9,54
Placebogruppe										
2	-2,40	4,33	6,50	12,58	8,88	0,00	3,80	11,02	9,34	14,01
6	2,90	4,25	7,68	-2,59	-0,94	-9,00	7,53	4,80	-2,35	1,96
8	0,00	29,25	21,80	22,65	11,88	-9,61	2,19	7,17	4,27	6,47
11	-4,71	19,65	6,99	12,42	6,46	1,86	8,84	5,44	12,59	20,74
17	-2,83	-7,66	6,62	2,61	2,93	4,81	-12,86	-2,98	6,03	6,85
19	8,63	23,85	21,39	28,76	0,00	20,15	14,95	8,03	7,76	2,79
22	-0,36	14,13	11,28	15,90	8,10	-1,15	7,25	4,22	5,89	2,43
23	2,05	0,00	7,39	11,20	9,04	0,30	8,66	1,06	1,83	4,76
25	7,07	8,99	0,87	7,20	4,93	3,01	4,42	2,45	1,17	6,56
28	5,67	9,01	14,37	16,57	4,67	26,10	0,27	-2,68	14,20	22,57
30	3,89	7,98	7,60	10,79	18,24	-0,21	16,99	17,05	6,73	10,60
Anzahl										
	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Mittelwert										
	1,81	10,34	10,23	12,55	6,74	3,30	5,64	5,05	6,13	9,07
SD										
	4,29	10,74	6,51	8,68	5,45	10,85	7,93	5,84	4,89	7,18
SEM										
	1,29	3,24	1,96	2,62	1,64	3,27	2,39	1,76	1,47	2,17
Median										
	2,05	8,99	7,60	12,42	6,46	0,30	7,25	4,80	6,03	6,56
T-Test										
	0,35	0,54	0,33	0,62	0,84	0,72	0,22	0,27	0,12	0,90

8.3 BMI-Werte

Patient	Körpergewicht [kg]	Körpergröße [m]	BMI [kg/m ²]
Verumgruppe			
1	68	173	22,7
3	110	182	33,2
5	101	192	27,4
9	50	160	19,5
12	67	172	22,6
13	76	186	22,0
16	52	156	21,4
18	47	162	17,9
21	58	158	23,2
27	86	181	26,3
29	66	167	23,7
31	88	188	24,9
Anzahl	12	12	12
Mittelwert	72,4	173,1	23,7
SD	20,3	12,6	4,0
SEM	5,9	3,6	1,1
Median	67,5	172,5	23,0
Placebogruppe			
2	60	160	23,4
6	75	179	23,4
8	85	186	24,6
11	77	183	23,0
17	65	180	20,1
19	66	178	20,8
22	80	187	22,9
23	50	165	18,4
25	52	161	20,1
28	67	177	21,4
30	78	185	22,8
Anzahl	11	11	11
Mittelwert	68,6	176,5	21,9
SD	11,5	9,9	1,9
SEM	3,5	3,0	0,6
Median	67,0	179,0	22,8

8.4 eNO-Werte (in ppb)

Patient	Screening	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12
Verumgruppe												
1	10,6	17,7	23,3	76,0	59,0	70,2	76,1	103,8	112,0	105,6	102,5	81,6
3	18,9	20,0	40,1	70,3	49,2	29,3	67,8	101,0	96,5	77,8	99,9	110,5
5	28,0	37,5	65,4	102,6	133,8	136,6	89,5	121,3	131,8	173,0	134,3	120,4
9	58,6	71,4	64,3	72,5	113,9	164,0	107,0	121,9	152,1	117,8	140,0	129,4
12	17,3	10,8	24,8	27,7	39,2	42,1	30,9	31,1	36,7	55,3	50,1	21,1
13	55,8	38,0	89,9	98,2	155,8	165,6	133,9	200,2	185,7	204,8	204,7	181,0
16	54,5	37,1	69,2	143,4	169,8	174,1	110,5	138,4	169,0	162,3	158,1	75,1
18	21,3	6,8	12,2	16,3	24,1	36,6	18,8	47,5	53,2	69,8	63,2	28,2
21	38,7	21,9	36,7	63,9	81,0	74,7	41,0	53,1	86,1	87,4	73,5	47,1
27	19,8	36,7	43,9	38,2	36,4	32,3	24,9	-	34,3	35,5	31,4	23,7
29	7,6	6,4	30,2	43,3	47,4	42,2	24,7	33,1	50,6	74,1	64,4	20,2
31	31,5	33,6	72,9	97,4	123,1	127,5	91,7	150,0	165,1	144,5	151,0	109,0
Anzahl												
	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12	12
Median												
	24,65	27,75	42,00	71,40	70,00	72,45	71,95	103,80	104,25	96,50	101,20	78,35
Mittelwert												
	30,22	28,16	47,74	70,82	86,06	91,27	68,07	100,13	106,09	108,99	106,09	78,94
Min												
	7,60	6,40	12,20	16,30	24,10	29,30	18,80	31,10	34,30	35,50	31,40	20,20
Max												
	58,60	71,40	89,90	143,40	169,80	174,10	133,90	200,20	185,70	204,80	204,70	181,00
Stabw												
	17,86	18,30	24,02	36,26	50,82	57,91	39,33	53,98	54,71	52,17	52,05	52,26
SEM												
	5,15	5,28	6,93	10,47	14,67	16,72	11,35	16,28	15,79	15,06	15,02	15,09
Placebogruppe												
2	67,3	85,0	137,9	110,4	185,4	236,8	214,1	239,8	231,0	230,8	209,6	180,4
6	23,3	28,1	30,0	41,3	70,3	66,5	52,0	97,1	128,1	108,9	93,6	48,6
8	43,2	35,3	45,2	173,0	125,3	250,0	198,7	218,0	133,7	234,6	252,4	178,4
11	41,5	56,2	108,0	173,0	167,7	158,8	125,7	159,4	150,8	134,2	142,0	105,4
17	23,6	29,8	49,4	78,8	111,7	111,9	71,5	87,3	77,0	93,9	89,9	54,2
19	25,1	42,7	160,4	231,7	181,1	243,8	119,2	142,1	191,3	180,6	193,4	125,9
22	42,1	45,5	125,0	157,8	197,9	210,0	188,9	214,9	249,2	291,3	290,6	168,5
23	19,6	47,5	74,6	117,4	142,2	134,1	147,5	153,2	168,2	172,6	130,6	93,5
25	14,6	21,0	28,7	43,2	71,3	75,5	62,4	72,3	66,7	99,2	76,4	57,0
28	6,8	11,6	41,5	60,3	74,2	98,3	55,1	79,2	76,8	61,5	74,7	67,2
30	20,9	43,7	54,6	70,1	85,5	105,3	56,7	73,7	125,1	104,9	104,0	57,1
Anzahl												
	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Median												
	23,60	42,70	54,60	110,40	125,30	134,10	119,20	142,10	133,70	134,20	130,60	93,50
Mittelwert												
	29,82	40,58	77,75	114,27	128,42	153,73	117,44	139,73	145,26	155,68	150,65	103,29
Min												
	6,80	11,60	28,70	41,30	70,30	66,50	52,00	72,30	66,70	61,50	74,70	48,60
Max												
	67,30	85,00	160,40	231,70	197,90	250,00	214,10	239,80	249,20	291,30	290,60	180,40
Stabw												
	17,09	19,56	46,91	62,53	49,29	69,82	62,47	62,85	60,98	72,30	74,91	52,37
SEM												
	5,15	5,90	14,14	18,85	14,86	21,05	18,84	18,95	18,39	21,80	22,59	15,79
T-Test												
	0,96	0,13	0,06	0,05	0,06	0,05	0,03	0,03	0,13	0,12	0,09	0,11

8.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Ermittlung der Niederdosis.....	Seite 17
	Die Abbildung zeigt exemplarisch das Screening-Protokoll der FEV ₁ -Werte von Patient Nr. 13. Die gestrichelte horizontale Linie markiert den fünfprozentigen Abfall der FEV ₁ , die gestrichelte vertikale Linie markiert die daraus resultierende Niederdosis	
Abbildung 2:	Einsatz kurzwirksamer β_2 -Agonisten (Hübe).....	Seite 20
Abbildung 3:	Mittlere FEV ₁ -Basiswerte (in Litern \pm SEM).....	Seite 21
Abbildung 4:	Geometrisches Mittel der PD ₂₀ (in mg \pm SEM)	Seite 22
Abbildung 5:	Mittlerer FEV ₁ -Abfall.....	Seite 23
	(in % zum Basiswert vor Provokation \pm SEM)	

8.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Patientencharakteristika.....	Seite 9
Tabelle 2:	Studiendesign.....	Seite 12
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Fettsäurekapseln.....	Seite 15
Tabelle 4:	PD ₂₀ -Werte (in mg).....	Seite 22
Tabelle 5:	Mittlerer FEV ₁ -Abfall (%)......	Seite 24
	Die genannten Werte geben den mittleren prozentualen Abfall der Einsekundenkapazität innerhalb 30 min nach niedrig-dosierter Allergenbelastung wieder. Die Visiten V1 und V12 sind nicht aufgeführt, da zu diesen Visiten keine niedrig-dosierte Allergenbelastung vorgenommen wurde.	
Tabelle 6:	Studien zum Zusammenhang zwischen niedrig-dosierter Allergenbelastung und dem Auftreten klinischer Symptome	Seite 27

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Stefan Zielen danken für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation, seine freundliche Unterstützung, sowie die großzügige Bereitstellung von Mitarbeitern und Sachmitteln. Er führte mich in die Thematik ein und beeindruckte mich nachhaltig durch sein leidenschaftliches Interesse an medizinischer Forschung und seine profunde Kenntnis der Materie. Nahezu spielerisch übertrug sich diese Leidenschaft im Laufe der Zeit und führte dazu, dass mein Interesse an wissenschaftlichem Arbeiten nachhaltig geweckt wurde.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ralf Schubert für seine stets freundliche Unterstützung bei allen Fragen (nicht nur) rund um die Durchführung der Studie, die Hilfestellung bei der Datenauswertung, sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Richard Kitz und Herrn Dr. Markus Rose danken, die stets für Rückfragen zur Verfügung standen und sich immer wieder Zeit nahmen für weitergehende Erläuterungen zur Thematik.

Herrn Dr. Olaf Eickmeier danke ich für die hilfreichen Tipps bei der Planung und Durchführung der Studie.

Ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Ambulanz für Pädiatrische Pneumologie, ohne deren tatkräftige Unterstützung die Durchführung vorliegender Studie nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt und in besonderem Maße danke ich Herrn Adrian Lieb für die überaus kollegiale und stets konstruktive Zusammenarbeit während der gesamten Dauer dieses Dissertationsvorhabens.

Meiner Familie möchte ich ganz herzlich danken für die kritische Durchsicht des Manuskripts auf Rechtschreibfehler, sowie deren seelische und moralische Unterstützung.

Praktisches Jahr	02/2007 – 06/2007	Anästhesiologie University of California San Francisco Dept. of Anesthesia and Perioperative Care Leitung: Prof. Ronald D. Miller, MD
	06/2007 – 07/2007	Chirurgie Krankenhaus Nordwest Frankfurt Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Minimal Invasive Chirurgie Leitung: Prof. Dr. med. Thomas W. Kraus
	08/2007 – 09/2007	Chirurgie Georgetown University Washington D.C. Washington Hospital Center Dept. of Trauma Services Leitung: Prof. David Ciesla, MD
	10/2007 – 01/2008	Innere Medizin Krankenhaus Nordwest Frankfurt Medizinische Klinik, Med. Notaufnahme Leitung: Prof. Dr. med. S. Rossol, M.Sc. Klinik für Onkologie und Hämatologie Leitung: Prof. Dr. med. E. Jäger
Auslandsaufenthalte	01.08. – 31.08.2005	Famulatur Innere Medizin Universitätsklinik für Innere Medizin II Angiologie / Kardiologie, AKH Wien
	26.02. – 03.06.2007	Praktisches Jahr, Terial Anästhesiologie University of California San Francisco Dept. of Anesthesia and Perioperative Care Leitung: Prof. Ronald D. Miller, MD
	06.08. – 30.09.2007	Praktisches Jahr, Terial Chirurgie Georgetown University Washington D.C. Washington Hospital Center Dept. of Trauma Services Leitung: Prof. David Ciesla, MD

Sonstiges

- 04.04. – 08.04.2005 Strahlentherapie / Radioonkologie
Klinikum Villingen-Schwenningen
- 05.05.2005 Basis Life Support-Training der
American Heart Association
- 12.07. – 13.07.2005 Advanced Cardiovascular Life Support-
Training der American Heart Association

Ehrenämter

- 15.06. – 29.06.2005 Ehrenamtlicher Mitarbeiter (Volunteer)
FIFA Confederations Cup 2005 Germany
Bereich Anti-Doping-Kontrolle
- 09.06. – 09.07.2006 Ehrenamtlicher Mitarbeiter (Volunteer)
FIFA World Cup 2006 Germany
Bereich Anti-Doping-Kontrolle
- 22.07. – 23.07.2006 Ehrenamtlicher Mitarbeiter (Volunteer)
Ironman European Championship 2006
Bereich Anti-Doping-Kontrolle
- 29.06. – 01.07.2007 Ehrenamtlicher Mitarbeiter (Volunteer)
Ironman European Championship 2007
Bereich Anti-Doping-Kontrolle



Frankfurt am Main, den 08.04.2008

Schriftliche Erklärung:

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Sicherheit und Verträglichkeit einer niedrig-dosierten Allergenprovokation bei Patienten mit Hausstaubmilbenallergie und leichtem Asthma bronchiale unter Supplementierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren (*n*-3 PUFA)“

im Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Herrn Professor Dr. med. Stefan Zielen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'P. Saw', written in a cursive style.

Frankfurt am Main, den 08.04.2008