

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Schick

**Nutzen der nasalen Differentialzytologie zur Prädiktion des  
Therapieansprechens und zum Therapiemonitoring von Patienten mit einer  
chronischen Rhinosinusitis mit Polyposis unter Dupilumab- Therapie  
– eine monozentrische, prospektive, klinische Anwendungsstudie**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2023

Zeynep Danisman

geb. am: 06.08.1998 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 01.03.2024

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester

3. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Summary.....	3
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
2.1	Rhinosinusitis .....	5
2.1.1	Definitionen, Klassifikationen, Epidemiologie.....	5
2.1.2	Symptome der Rhinosinusitis .....	9
2.1.3	Kosten der Rhinosinusitis .....	10
2.2	Chronische Rhinosinusitis .....	11
2.2.1	Epidemiologie, Ätiologie, Risikofaktoren .....	11
2.2.2	Molekulare Pathogenese der CRSwNP .....	13
2.2.3	Diagnostik, Therapie und klinisches Management von CRSwNP-Patienten .....	15
2.2.4	Dupilumab.....	20
2.2.5	Weitere Biologika in der Therapie der CRSwNP .....	27
2.2.6	Ziele der Therapie der CRSwNP .....	28
2.3	Nasale Abstrichzytologie.....	30
2.4	Ziele der Arbeit / Fragestellung.....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
3.1	Verbrauchsmaterialien .....	33
3.1.1	Chemikalien, Puffer und Lösungen .....	35
3.1.2	Geräte und zugehörige Software.....	36
3.2	Patienten und Studienvsiten.....	37

3.3	Patientenrekrutierung und Begutachtung.....	38
3.4	Abstrichzytologie.....	39
3.4.1	Färbung zytologischer Präparate nach einer modifizierten May-Grünwald-Giemsa Methode .....	40
3.4.2	Etablierung der MGG-Färbung.....	40
3.4.3	Zytomorphologische Auswertung und Beurteilung der Zelldifferenzierung .....	41
3.5	Untersuchungen an Patientenblut .....	42
3.6	Polypenscore.....	43
3.7	SNOT-20 Fragebogen.....	43
3.8	Olfaktometrie.....	45
3.9	Proteinbiochemische Methoden.....	45
3.9.1	Antikörper .....	45
3.9.2	Immunzytochemie.....	45
3.9.3	Etablierung der immunzytochemischen ECP-Färbung.....	49
3.9.4	Herstellung der Granulozyten-Konzentrate .....	50
3.10	Analytische Methoden .....	52
3.10.1	Semiquantitative Auswertung der zytologischen Präparate.....	52
3.10.2	Statistische Analyse .....	54
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
4.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	56
4.2	Ergebnisse der immunzytochemischen Etablierung.....	57
4.3	Auswertung der einzelnen Parameter .....	58
4.3.1	Zytomorphologische Auswertung der MGG-Präparate.....	59

4.3.2	Auswertung der Blutuntersuchung .....	62
4.3.3	Polypenscore und SNOT-20 Fragebogen .....	63
4.3.4	Auswertung der Olfaktometrie .....	64
4.3.5	Auswertung der immunzytochemischen Färbungen.....	64
4.4	Unterteilung des Patientenkollektivs anhand der eosinophilen Granulozyten in eine Eo-low und Eo-high Gruppe.....	65
4.5	Korrelation der einzelnen Parameter .....	66
4.6	Untersuchung des Therapieansprechens.....	68
4.7	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse.....	71
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>72</b>
5.1	Untersuchung der Nasenabstriche .....	73
5.1.2	Technik der nasalen Abstrichzytologie.....	74
5.1.3	Prognostische Implifikationen einer Eosinophilie bei CRSwNP.....	77
5.2	Vergleich der klinischen Ergebnisse mit dem aktuellen Stand der Literatur .....	79
5.3	Korrelation der einzelnen Parameter .....	80
5.4	Kritische Betrachtung methodischer Aspekte der eigenen Untersuchung und Verbesserungsmöglichkeiten.....	81
5.5	Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der aktuellen Literatur .....	85
5.6	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	87
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKATIONEN / DANKSAGUNG.....</b>	<b>104</b>
7.1	Publikationen .....	104
7.2	Danksagung .....	105

<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>110</b>
9.1	Patienteninformation.....	110
9.2	Einwilligungserklärung.....	115
9.3	Datenschutzaufklärung .....	117
9.4	Indikationsstellung zur Therapie der CRSwNP mit Biologika.....	120
9.5	MGG- und ICC-Bilder.....	121

---

## Abkürzungsverzeichnis

AFRS	<i>allergic fungal rhinosinusitis</i>
AMT	<i>appropriate medical therapy</i>
ARS	<i>Akute Rhinosinusitis</i>
ATAD	<i>aspirin treatment after aspirin desensitization</i>
BSA	<i>Bovines Serum Albumin</i>
BZ	<i>Becherzellen</i>
CCAD	<i>central compartment allergic disease</i>
CF	<i>cystic fibrosis</i>
CRS	<i>Chronische Rhinosinusitis</i>
CRSsNP	<i>Chronic Rhinosinusitis without Nasal Polyps</i>
CRSwNP	<i>Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps</i>
CS	<i>Corticosteroide</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
DVT	<i>Digitale Volumetomographie</i>
eCRS	<i>eosinophilic chronic Rhinosinusitis</i>
EGPA	<i>Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss disease)</i>
EMA	<i>Europäische Arzneimittelkommission</i>
Eo	<i>Eosinophile Granulozyten</i>
EPOS2020	<i>European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020</i>
FESS	<i>Functional Endoscopic Sinus Surgery</i>
FZ	<i>Flimmerzellen</i>
GER	<i>Gastroösophagealer Reflux</i>
GPA	<i>Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's disease)</i>
HNO	<i>Hals-Nasen-Ohrenheilkunde</i>
hpf	<i>high power field</i>
HRQL	<i>health-related quality-of-life</i>
ICC	<i>immunzytochemischen</i>
IgE	<i>Immunglobulin E</i>
IL	<i>Interleukine</i>
INCS	<i>intranasal corticosteroids spray</i>
INF $\gamma$	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
IU	<i>international unit</i>
L	<i>Lymphozyten</i>
LMS	<i>Lund-Mackay Score</i>
LS	<i>least squares</i>
MGG	<i>May-Grünwald-Giemsa</i>
min	<i>Minuten</i>
ml	<i>Milliliter</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
N	<i>neutrophile Granulozyten</i>
NARES	<i>Nicht-allergische Rhinitis mit Eosinophilen Zellen</i>
NARESMA	<i>Nicht-allergische Rhinitis mit gemischten Zellen</i>
NARMA	<i>Nicht-allergische Rhinitis mit Mastzellen</i>
NARNE	<i>Nicht-allergische Rhinitis mit neutrophilen Granulozyten</i>
NCS	<i>nasal congestion score</i>
NPV	<i>Negative prädiktive Wert</i>
NSAID-ERD	<i>nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease</i>



---

OTC .....	<i>over-the-counter</i>
PARC .....	<i>pulmonary and activation-regulated chemokine</i>
PBS .....	<i>Phosphat buffered saline</i>
PCD .....	<i>Primary ciliary dyskinesia</i>
PROMS .....	<i>patient reporting outcome measures</i>
RARS .....	<i>Rezidivierende akute Rhinosinusitis</i>
RS .....	<i>Rhinosinusitis</i>
sec .....	<i>Sekunden</i>
SF-36 .....	<i>Short Form 36 Health Survey</i>
SNOT-22 .....	<i>22-item Sino-Nasal Outcome Test</i>
SV .....	<i>Studiensite</i>
SWOT .....	<i>strenght, weakness, opportunities and threat</i>
TARC .....	<i>tymus and activation-rugulated chemokine</i>
TH .....	<i>T-Helferzellen</i>
VAS .....	<i>visual analogue scale</i>
VCAM-1 .....	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA-4 .....	<i>Very late antigen 4</i>
µl .....	<i>Mikroliter</i>

# 1 Zusammenfassung

Die Chronische Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (CRSwNP) stellt ein relevantes Krankheitsbild nicht nur für die betroffenen PatientInnen, sondern auch für das öffentliche Gesundheitssystem verbunden mit erheblichen Kosten und Auswirkungen auf den Allgemeinzustand der betroffenen PatientInnen dar. In 80 % der europäischen und amerikanischen Fälle kann histopathologisch und molekulardiagnostisch eine Typ-2 Inflammation nachgewiesen werden. Der genaue Pathomechanismus ist allerdings noch ungeklärt und Gegenstand aktueller Forschungen. Die Schlüsselzytokine dieser Form der chronischen Entzündung sind die Interleukine-4, -5 und -13, welche unter anderem einen Verlust der Zelldifferenzierung induzieren.

Wenn die leitliniengerechte Therapie aus konservativer Medikation und/oder Operation (FESS: Functional Endoscopic Sinus Surgery) nicht ausreicht, können seit 2019 Biologika wie Dupilumab zur Therapie genutzt werden. Diese neue Therapieoption revolutionierte die CRSwNP Therapie seither. Dupilumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die Interleukin-4-Rezeptor- $\alpha$ -Unterheit gerichtet ist und somit das Signaling der Interleukine-4 und -13 inhibiert. Nach aktuellen Empfehlungen ist der Nachweis einer Typ-2 Inflammation als Therapieindikation nötig, welche an der Eosinophilen-Zellzahl im Differentialblutbild ( $\geq 250$  Zellen/ $\mu$ l), der Gesamt-IgE-Konzentration ( $\geq 100$  IU/ml) oder der Eosinophilen-Zellzahl im Gewebe ( $\geq 10$ /hpf) gemessen werden kann. Demnach sind Blutentnahmen und in einigen Fällen auch invasive operative Probeentnahmen nötig, um eine Therapieindikation zu stellen.

Die nasale Abstrichzytologie bietet im Gegensatz dazu eine nicht-invasive, einfache und kostengünstige Methode, um die Zusammensetzung der Nasenschleimhaut zu analysieren. Die nasale Abstrichzytologie wurde bisher noch nicht im Zusammenhang mit Biologika untersucht. Ziel unserer Pilotstudie war es aus diesem Grund, mit der nasalen Abstrichzytologie die zelluläre Zusammensetzung der nasalen Schleimhaut- und Entzündungszellen von PatientInnen mit chronisch-polypöser Sinusitis (CRSwNP) zu untersuchen, die eine systemische Therapie mit Dupilumab erhalten, um die diagnostische Wertigkeit der Abstrichzytologie als prädiktiven Marker für ein Ansprechen auf eine Dupilumabtherapie zu evaluieren und zu untersuchen, ob die nasale Abstrichzytologie zum Therapiemonitoring genutzt werden kann.

In unserer monozentrischen, prospektiven klinischen Studie wurden 20 CRSwNP-PatientInnen mit einer Indikation für eine Dupilumab- Therapie eingeschlossen und zu insgesamt fünf Studienvisiten ab Therapiebeginn im Abstand von jeweils drei Monaten mit einer bei der jeweiligen Studienvisite durchgeführten nasalen Abstrichentnahme eingeladen. Die Abstriche wurden

zunächst nach der May- Grünwald- Giemsa (MGG) Methode gefärbt und der prozentuale Anteil der verschiedenen Zelltypen ausgewertet. Anschließend erfolgte eine immunzytochemische (ICC) ECP-Färbung, um spezifisch die eosinophilen Granulozyten zu detektieren. Zusätzlich wurden bei jeder Studienvisite der Polypenscore, der SNOT-20 Fragebogen zur Erhebung der mit einer chronischen Rhinosinusitis assoziierten Symptome, die Serum IgE-Konzentration im Blut und die eosinophilen Granulozyten im Differentialblutbild erhoben. Der Verlauf der jeweiligen Parameter wurde über ein Jahr evaluiert und die Korrelation zwischen klinischem Ansprechen und Differentialzytologie getestet.

Es zeigte sich sowohl in der MGG- ( $p < 0,0001$ ) als auch in der ICC-Auswertung ( $p < 0,001$ ) eine signifikante Abnahme der eosinophilen Zellzahl im Therapieverlauf. Außerdem zeigte sich, dass das Ergebnis statistisch signifikanter war, je weiter die einzelnen Studienvisiten voneinander entfernt waren. Bei der Einteilung der MGG-Präparate in eine Eo-low ( $< 21\%$ ) und Eo-high-Gruppe ( $\geq 21\%$ ) anhand der prozentualen eosinophilen Zellzahl vor Therapiebeginn, zeigte die Eo-high-Gruppe eine stärkere Abnahme ( $\Delta 17,82$ ) im Vergleich zu der Eo-low-Gruppe ( $\Delta 10,67$ ). Auch der Polypenscore, der SNOT-20 Fragebogen und die Gesamt-IgE-Konzentration zeigten jeweils eine signifikante Abnahme im Verlauf ( $p < 0,0001$ ). Anhand des Medians der durchschnittlichen Veränderung im Polypenscore und im SNOT-20 Fragebogen wurden die Patienten in “good-responder” und “low-responder” eingeteilt. Anschließend wurden beide Gruppen bezüglich der Eosinophilen im Nasenabstrich, den Eosinophilen im Differentialblutbild und dem Gesamt-IgE Wert verglichen, wobei keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die nasale Differentialzytologie das Potential hat, als nicht-invasiver prädiktiver Biomarker das Therapieansprechen auf die sehr kostenintensive Behandlung mit Dupilumab vorherzusagen und so eine zielgerichtete und personalisierte Therapieplanung und –durchführung von CRSwNP- Patienten zu ermöglichen. Als einfache Methode kann sie in allen Altersklassen und auch bei Bedarf wiederholt angewendet werden und hat dadurch auch die Chance in niedergelassenen Arztpraxen genutzt zu werden. Da die Validität der nasalen Abstrichzytologie als prognostischer und prädiktiver Marker in unserer Studie aufgrund der begrenzten Patientenzahl noch eingeschränkt war, sind weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv nötig, um die Wertigkeit der nasalen Abstrichzytologie und der zytologisch detektierten eosinophilen Zellzahl als Biomarker in der Biologikatherapie von CRSwNP-PatientInnen weiter zu evaluieren.

## 1.1 Summary

### **Value of differential nasal swab cytology for therapy monitoring and prediction of therapy response in chronic rhinosinusitis with nasal polyps treated with Dupilumab**

Chronic Rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a common chronic disease with a high impact on patients' quality of life. In 80 % of all CRSwNP patients in Europe and the US histopathological and molecular diagnostics reveal a type-2 inflammation as major driver of this chronic inflammatory disease. While the detailed pathogenesis is still not fully understood, recent research suggests a host-environmental hypothesis with a dysfunctional host response, which causes an epithelial barrier dysfunction and leads to a chronic inflammation of the nasal and sinus mucosa. The key cytokines in this inflammatory cascade are Interleukin-4, -5 and -13 inducing a loss of cellular differentiation, reduced junctional integrity, and an impaired innate immune defense. If conservative and surgical guideline treatment cannot sufficiently control disease burden, biologicals can be considered as a comparably new treatment option that has revolutionized CRSwNP therapy since the first approval of Dupilumab in 2019. Dupilumab is a monoclonal antibody directed against the IL-4 receptor alpha subunit which inhibits the signaling of the type-2 cytokines IL-4 and IL-13 and demonstrated clinical efficacy and acceptable safety in CRSwNP and other type-2 diseases (e.g. atopic dermatitis and asthma). According to current recommendations type-2-inflammation is evident if one can find a blood eosinophil cell count  $\geq 250/\mu\text{l}$ , or a total IgE concentration  $\geq 100$  IU/ml, or a tissue eosinophil cell count  $\geq 10/\text{hpf}$ . Accordingly, a peripheral blood sample and in many cases also invasive surgical tissue sampling is required for therapeutic decision making. With nasal cytology we herein evaluated a more simple and cost-effective method to study the pattern and profile of different cell types in the nasal mucosa with the aim to select patients who benefit from this new treatment. Nasal cytology has not been tested before in the context of biologic therapy and therefore no comparative literature is available. Against this background, our pilot study aimed to investigate differential nasal swab cytology as a potential tool for monitoring Dupilumab treatment and predicting therapy response to Dupilumab in a monocentric prospective clinical trial including a total of  $n=20$  CRSwNP patients that were monitored with nasal swab cytology over a one-year period. In total, five study visits (SV) were conducted with ambulatory nasal differential cytology using nasal swabs starting with the beginning of therapy and followed by visits every 3 months for 12 months. First, these cytology samples were stained according to the May-Grunwald-Giemsa method (MGG) and the percentage of ciliated cells, mucinous cells,

eosinophil cells, neutrophil cells, and lymphocytes were analyzed. Secondly, an immunocytochemical (ICC) ECP-staining was performed to detect eosinophil granulocytes. Additionally, during each study visit the nasal polyp score, SNOT-20 questionnaire, olfactometry, the total IgE concentration in peripheral blood as well as the eosinophil cell count in peripheral blood were recorded. The change of parameters was evaluated over one year and the correlation between clinical effectiveness and nasal differential cytology was analyzed.

In both MGG ( $p < 0.0001$ ) and ICC analysis ( $p < 0.001$ ) a significant decrease of eosinophils was seen under Dupilumab treatment. When patients were divided into an Eo-low- ( $< 21\%$ ) and Eo-high- ( $\geq 21\%$ ) group according to the percentage of eosinophils in nasal swab cytology in the first study visit, the Eo-high-group showed a greater change of eosinophils over time ( $\Delta 17.82$ ) compared to the Eo-low-group ( $\Delta 10.67$ ) but, however, no better response to therapy. The nasal polyp score, SNOT-20 questionnaire, and total IgE concentration in peripheral blood showed a significant decrease during the observation period, too ( $p < 0.0001$ ). In a next step, we divided the patients into a “good-responder” and “poor-responder” group according to the median of the delta changes in nasal polyp-score and the SNOT-20 questionnaire score from SV1 to SV5. When comparing the initial percentage of eosinophils in nasal swab in MGG- and ICC-staining, eosinophils in peripheral blood and total serum-IgE level between the “good-responder”- and “poor-responder”-group, no significant differences were seen.

In summary, nasal swab cytology as an easy-to-apply diagnostic method allows detection and quantification of the different cell populations within the nasal mucosa at a given time. The nasal differential cytology showed a significant decrease of eosinophils during Dupilumab therapy and can therefore be used as non-invasive method for monitoring therapy success of this cost intensive therapy and potentially can allow an optimized individual therapy planning and management for CRSwNP patients. Since the validity of initial nasal swab eosinophil cell count as a predictive biomarker for therapy response was limited in our study, additional studies including larger number of participants will be necessary to further evaluate the potential benefits for clinical practice of this new diagnostic method.

## 2 Einleitung

Patienten, die an einer Rhinosinusitis (RS) leiden, zeigen häufig ausgeprägte Symptome, welche die Produktivität und Lebensqualität erheblich einschränken. So beeinflusst eine chronische RS die Lebensqualität der Betroffenen stärker als beispielsweise eine Angina pectoris oder eine chronische Herzinsuffizienz (GLIKLICH, METSON, 1995; KHAN et al., 2019). Im Folgenden soll dieses Krankheitsbild näher beleuchtet werden. Zunächst werden die verschiedenen Formen der RS definiert und anschließend die molekularen und pathophysiologischen Grundlagen dieses Krankheitsbildes näher beleuchtet, wobei der Schwerpunkt entsprechend des in dieser Arbeit betrachteten Patientenkollektivs auf der chronischen RS liegt. Anschließend wird der Antikörper Dupilumab vorgestellt und das Verfahren der nasalen Abstrichzytologie erläutert.

### 2.1 Rhinosinusitis

#### 2.1.1 Definitionen, Klassifikationen, Epidemiologie

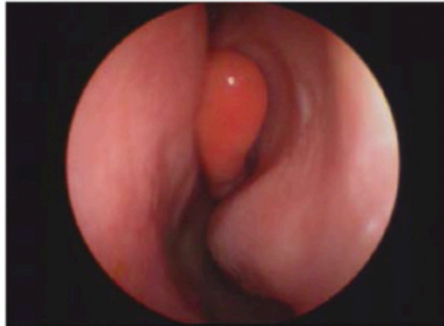
Zu unterscheiden ist eine akute von einer chronischen Rhinosinusitis.

Die akute Rhinosinusitis (ARS) hat eine Ein-Jahres-Prävalenz von 6-15 % in der Allgemeinbevölkerung und wird in der Regel durch einen viralen Infekt hervorgerufen (MELTZER, HAMILOS, 2011). Sie ist definiert durch ein plötzliches Auftreten von zwei oder mehr Hauptsymptomen (u.a. nasale Obstruktion und Sekretion, Riechstörungen; *komplette Auflistung der charakteristischen Symptome s. 2.1.2*) für unter zwölf Wochen (FOKKENS et al., 2020). Es ist möglich, dass innerhalb dieser zwölf Wochen auch symptomfreie Intervalle auftreten. Eine ARS ist zwar in der Regel selbstlimitierend, aber auch einer der häufigsten Gründe einer Antibiotikatherapie (MELTZER, HAMILOS, 2011). Dies ist aufgrund der steigenden Zahl an Antibiotikaresistenzen ein erhebliches Problem (CASSINI et al., 2019). Eine rezidivierende akute Rhinosinusitis (RARS) ist gekennzeichnet durch mindestens vier Episoden einer akuten RS im Zeitraum von 12 Monaten mit zwischenzeitlich vollständiger Rückbildung der Symptomatik.

Die Chronische Rhinosinusitis (CRS) stellt ein relevantes Krankheitsbild nicht nur für die betroffenen Patienten, sondern auch für das öffentliche Gesundheitssystem verbunden mit erheblichen Kosten und Auswirkungen auf den Allgemeinzustand der betroffenen Patienten dar. In der europäischen Bevölkerung beklagen ca. 13 % der Menschen CRS Beschwerden (HASTAN et al., 2011). In der US-Bevölkerung sind es sogar 16 % (SHASHY et al., 2004). Die CRS ist definiert durch ein anhaltendes Auftreten von zwei oder mehr Hauptsymptomen (u.a. nasale

Obstruktion und Sekretion, Riechstörungen; *komplette Auflistung der Symptome s. 2.1.2*) für einen Zeitraum länger als zwölf Wochen (FOKKENS et al., 2020). Zur weiteren Klassifizierung von Unterformen der CRS existieren verschiedene Ansätze, die im Folgenden dargestellt werden sollen. Es wird eine CRS mit (with, CRSwNP) oder ohne (sine, CRSsNP) nasale Polypen unterschieden (KOENNECKE et al., 2018). Polypen sind entzündliche Auswucherungen des sinonasalen Epithels und manifestieren sich als ödematöse Raumforderungen vor allem im mittleren Nasengang (SETTIPANE et al., 2013). Der Schweregrad der Polyposis nasi wird anhand der Polypen-Ausdehnung in der endoskopischen Untersuchung klassifiziert und ist in *Abbildung 1* veranschaulicht (MELTZER et al., 2006). Während im ersten Stadium kleine Polypen im mittleren Nasengang zu erkennen sind, füllen die Polypen im zweiten Stadium den kompletten mittleren Nasengang aus. Im dritten Stadium dehnen sich die Polypen über den mittleren Nasengang hinaus aus, befinden sich aber noch kranial der unteren Nasenmuschel, im Gegensatz zum vierten Stadium, wo die komplette Nasenhöhle mit Polypen befallen ist (MELTZER

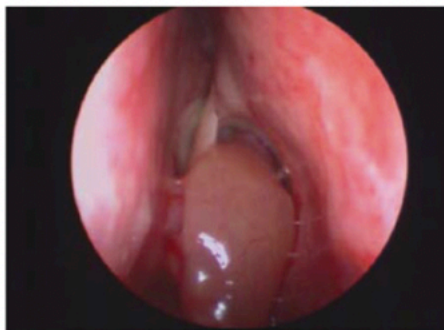
et al., 2006). Histopathologisch lässt sich in 80 % der Fälle in den USA und Europa im Polypengewebe eine Infiltration mit eosinophilen Granulozyten feststellen (SETTIPANE et al., 2013).



Stage 0 Endoscopy: No polyps visualized and open middle meatus



Stage 1 Endoscopy: Small polyps noted in middle meatus



Stage 2 Endoscopy: Middle meatus completely filled with polypoid disease



Stage 3 Endoscopy: Polyps extending out of middle meatus but above the inferior turbinate

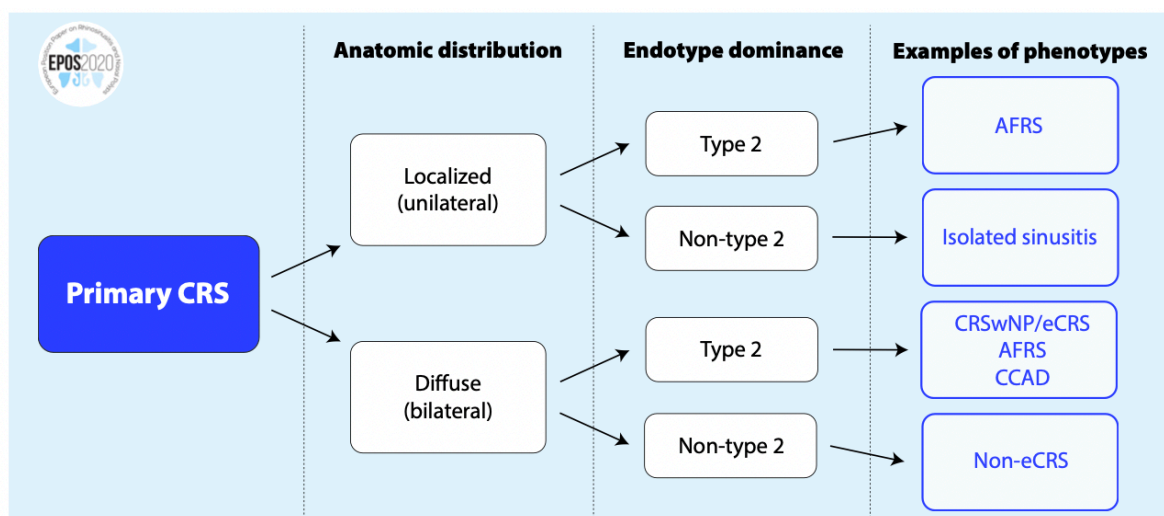


Stage 4 Endoscopy: Massive nasal polyposis completely filling the entire nasal cavity and sphenoid-ethmoid regions.

**Abbildung 1** Einteilung der Polyposis Nasi, (MELTZER et al., 2006).

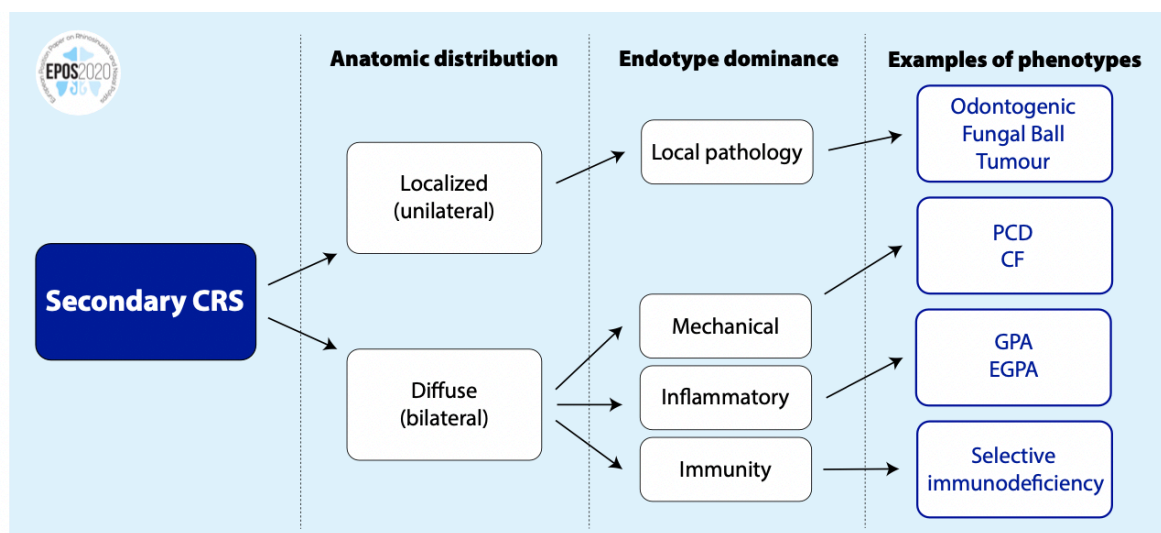


Bei der CRSsNP handelt es sich um eine chronische Entzündung der Schleimhäute der Nasennebenhöhlen, die nicht mit einer reaktiven Hyperplasie der Schleimhaut im Sinne einer Polypenbildung, sondern vermehrter Sekretbildung und einem Schleimhautödem einhergeht. Weiterhin wird eine Gruppe an Difficult-to-treat (Schwer-zu-behandeln) RS definiert (LIAO et al., 2018). Dazu zählen Patienten, die trotz adäquater Therapie (s.2.2.3) persistierende Symptome der RS aufweisen (HELLINGS et al., 2013). Die CRS wird im European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020 (EPOS2020) wiederum in zwei Gruppen aufgeteilt: die primäre und die sekundäre CRS (s. *Abbildung 2, Abbildung 3*). Sowohl die primäre als auch die sekundäre CRS werden dann nochmals anhand ihrer anatomischen Verteilung in eine lokale und diffuse CRS gegliedert. Bei der primären CRS wird die Dominanz des Endotyps berücksichtigt, also ob eine Typ-2 Inflammation (s. 2.2.1) festzustellen ist oder nicht (Non-type-2). Eine CRSwNP ist nach dieser Klassifikation also charakteristischerweise diffus/ bilateral verteilt und weist eine Typ-2 Inflammation auf (FOKKENS et al., 2020).



**Abbildung 2** Klassifizierung der primären CRS nach EPOS 2020, (FOKKENS et al., 2020), AFRS, allergic fungal rhinosinusitis; CCAD, central compartment allergic disease; CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; eCRS, eosinophilic CRS.

Die sekundäre CRS wird im Gegensatz dazu in lokale Pathologien und mechanische, entzündliche und immunologische Faktoren unterteilt (s. *Abbildung 3*). Im weiteren Verlauf werden wir uns hauptsächlich mit der CRSwNP beschäftigen, da für diese Patienten die Gabe von Dupilumab eine Therapieoption darstellt und folglich auch nur diese Patienten in die in dieser Arbeit vorgestellten Studie eingeschlossen wurden.



**Abbildung 3** Klassifizierung der sekundären CRS nach EPOS 2020, (FOKKENS et al., 2020), CF, cystic fibrosis; EGPA, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss disease); GPA, granulomatosis with polyangiitis (Wegener’s disease); PCD, primary ciliary dyskinesia.

### 2.1.2 Symptome der Rhinosinusitis

Klinisch ist das Krankheitsbild der Rhinosinusitis des Erwachsenen durch folgende drei Kriterien definiert, die einzeln oder auch in Kombination auftreten können (ORLANDI et al., 2021):

Zunächst muss eine Entzündung der Schleimhaut der Nasenhaupthöhle und/oder Nasennebenhöhlen vorliegen, die charakterisiert ist durch zwei oder mehr der Hauptsymptome. Dazu zählen eine Nasenatmungsbehinderung durch Obstruktion, ein Nasenausfluss (anteriore und/oder posteriore Sekretion), Gesichtsschmerzen und eine Riechstörung. Unter Riechstörung wird der Verlust (Anosmie) oder die verminderte Riechfähigkeit (Hyposmie) verstanden (CHUNG et al., 2015; GAINES, 2013; KOHLI et al., 2017; STEVENS et al., 2016). Diese Störung wird nicht nur durch die Obstruktion hervorgerufen, sondern auch durch die Entzündung selbst. Fakultative Symptome sind Fieber und Kopfschmerzen (FOKKENS et al., 2020; HIRSCH et al., 2017). Ein zweites Kriterium neben den von den Patienten berichteten Symptomen ist der endoskopische Nachweis von Nasenpolypen, mukopurulenter Verstopfung oder muköser Obstruktion vor allem des mittleren Nasengangs (AGARWAL et al., 2020). Das dritte Kriterium ist der computertomographische Nachweis von Veränderungen des ostiomeatalen Komplexes und/oder der Nasennebenhöhlen (HIRSCH et al., 2017).

Abbildung 4 zeigt die Prävalenz der Kardinalsymptome der CRS und Abbildung 5 den Schweregrad der Kardinalsymptome. Es ist zu erkennen, dass Nasenatmungsbehinderungen und Riechstörungen die häufigsten Symptome bei CRSwNP-Patienten darstellen.

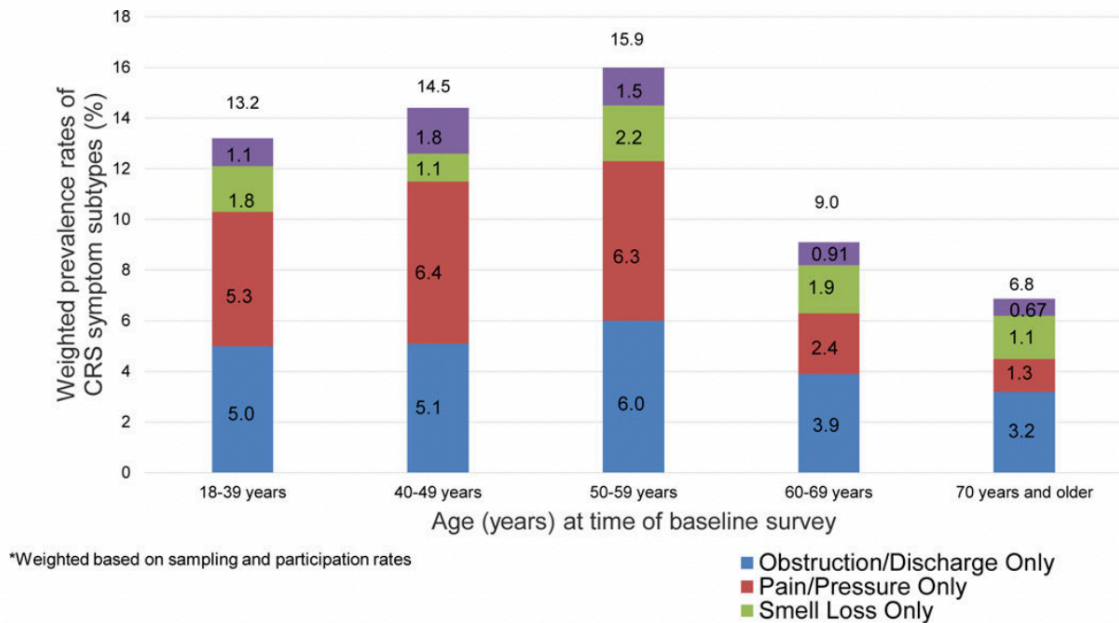


Abbildung 4 Prävalenz der Kardinalsymptome der CRS, modifiziert nach Hirsch (HIRSCH et al., 2017), CRS: Chronic Rhinosinusitis.

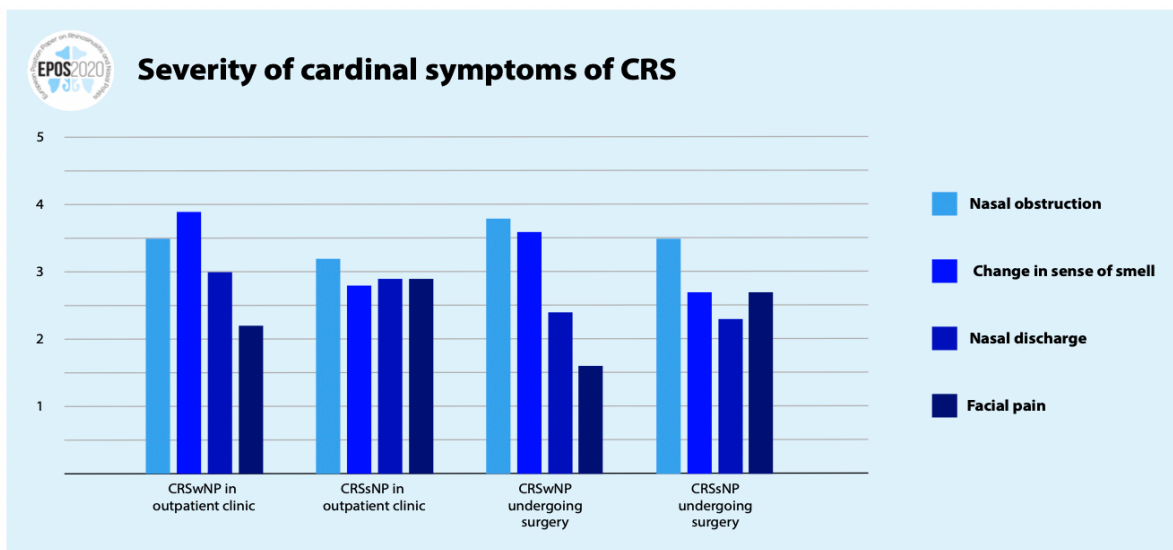


Abbildung 5 Schweregrade der Kardinalsymptome der CRS nach EPOS 2020, (FOKKENS et al., 2020), CRS: chronic rhinosinusitis; CRSsNP: chronic rhinosinusitis without nasal polyps; CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyps.

### 2.1.3 Kosten der Rhinosinusitis

Die Kosten der CRS für das Gesundheitssystem sind signifikant höher als beispielsweise die Kosten welche durch Magengeschwüre, akutes Asthma oder hohes Fieber verursacht werden (FOKKENS et al., 2020), was auch die gesundheitspolitische Relevanz dieses Krankheitsbildes aufzeigt. In den USA belaufen sich die direkten Kosten der CRS auf eine Summe zwischen 6,9

und 9,9 Billionen Dollar pro Jahr, also ca. 2 609 Dollar pro Patient und Jahr (SMITH et al., 2015). In Europa belaufen sich die direkten Kosten auf 2 500 Euro pro Patient und Jahr, wobei diese Kostensummen stetig steigen (VAN AGTHOVEN et al., 2002). Patienten, die nach einer ersten Operation der Nasennebenhöhlen zur chirurgischen Therapie der CRSwNP ein Rezidiv erleiden, sind dabei für die größten Kosten verantwortlich (BHATTACHARYYA et al., 2019; CHEN et al., 2020). Die indirekten Kosten der CRS sind allerdings weit höher als die direkten Kosten. Da 85 % der betroffenen Patienten im arbeitsfähigen Alter sind (18-65 Jahre), fallen erhebliche Kosten für fehlende Arbeitstage und eingeschränkte Produktivität bei der Arbeit an (CHEN et al., 2003; HELLINGS et al., 2013). Die RS gehört damit insgesamt zu den zehn teuersten Krankheiten des Gesundheitssystems der USA. So betragen die indirekten Kosten der CRS etwa 20 Billionen Dollar pro Jahr in der USA (HH et al., 2020).

## 2.2 Chronische Rhinosinusitis

### 2.2.1 Epidemiologie, Ätiologie, Risikofaktoren

Die Prävalenz der CRS in der Gesamtbevölkerung beträgt anamnestisch zwischen 5,5 % und 28 %, wobei Raucher häufiger betroffen sind (HAN et al., 2021; HIRSCH et al., 2017; REH et al., 2012). Ärztlich bestätigte Fälle der CRS, beispielweise durch einen computertomographischen Nachweis einer Verschattung der Nasennebenhöhlen, zeigen eine niedrigere Prävalenz von 3-6 % (FOKKENS et al., 2020). Auffällig ist, dass die CRS mit dem gleichzeitigen Vorliegen eines Asthma bronchiale assoziiert ist, da 25 % der CRS-Patienten auch gleichzeitig diese Diagnose aufweisen (HEDMAN et al., 1999; ZHANG et al., 2017), was sich durch gemeinsame auslösende Faktoren in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen erklären lässt (ROBINSON et al., 2017). Weitere Faktoren wie Rauchen, Luftverschmutzung und berufliche Exposition gegenüber Reizgasen korrelieren ebenfalls mit dem Auftreten von CRS-Symptomen (CHEN et al., 2003; FOKKENS et al., 2020; HIRSCH et al., 2017). Abhängig vom Phänotyp korreliert eine Allergie ebenfalls mit der Diagnose einer CRS und stellt damit einen wichtigen Risikofaktor dar, der auch in der Behandlung der CRS berücksichtigt werden sollte (ROSENFELD, 2007; STEVENS et al., 2017; TOMASSEN et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 45-60 Jahren, was eine „Host-Environment“-Hypothese annehmen lässt (Abbildung 6), die stark von der Umwelt und der Intensität exogener Stressoren abhängt (KERN et al., 2008). Die genaue Ätiologie der CRS wird weiter intensiv erforscht und

es wird bisher angenommen, dass viele Faktoren bei der Entstehung einer CRS zusammenspielen. Eine CRS resultiert nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft am wahrscheinlichsten aus einer dysfunktionalen Interaktion zwischen verschiedenen Umwelteinflüssen und dem Immunsystem (KERN et al., 2008).

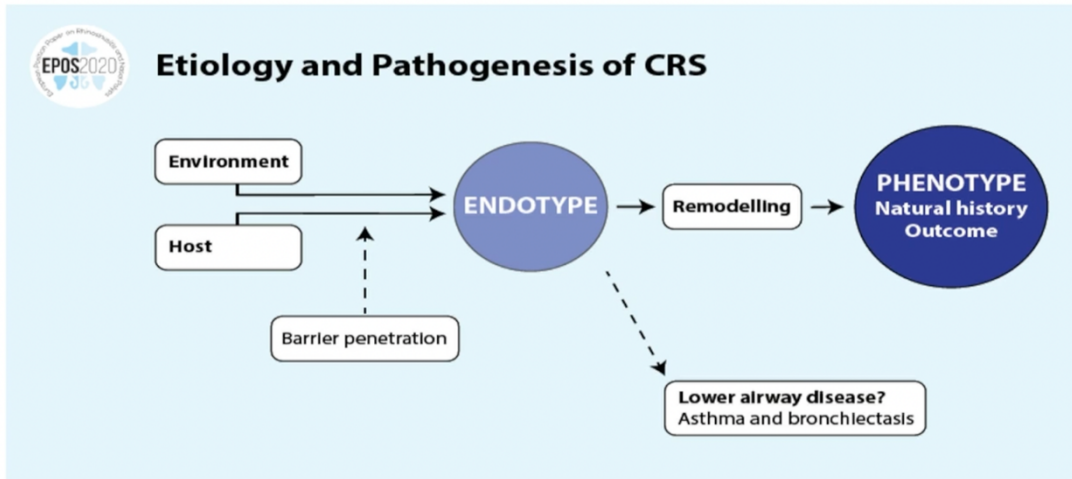


Abbildung 6 Ätiologie und Pathogenese der CRS nach EPOS 2020, (FOKKENS et al., 2020), CRS, chronic rhinosinusitis.

CRS-Patienten weisen eine gestörte Barriere des Nasenschleimhautepithels auf, was zu vereinfachtem Penetrieren von Pathogenen und dadurch zu chronischen Infektionen führt (s. 2.2.2). Je nach Endotyp findet dann fakultativ ein Remodelling statt, welches in der Folge zu dem charakteristischen Phänotyp der Nasenpolypen führt (AKDIS et al., 2013; TOMASSEN et al., 2016). Die verschiedenen molekularen Kaskaden, die bei diesem Prozess eine Rolle spielen, sind in Abbildung 7 veranschaulicht.

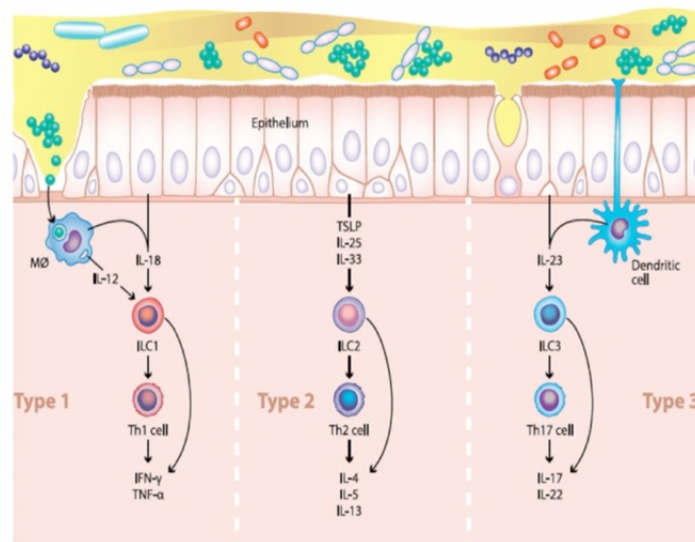
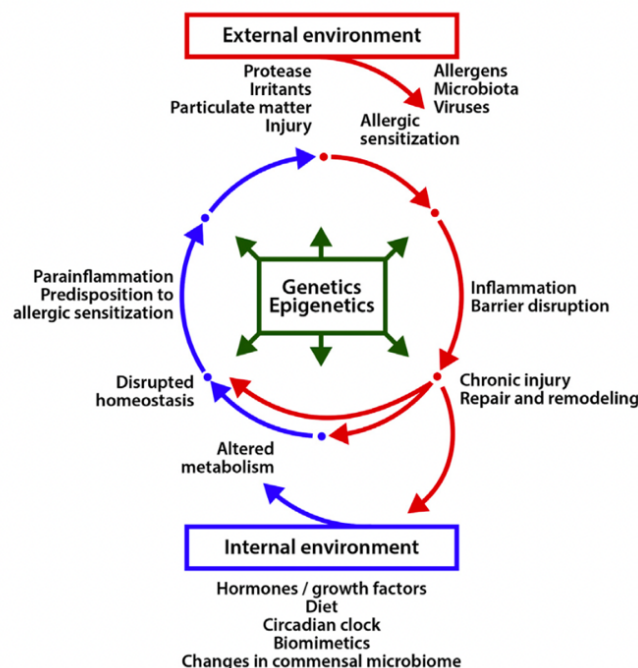


Abbildung 7 Molekulare Wege des Immunsystems bei gestörter Barriere nach EPOS 2020, (FOKKENS et al., 2020). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Aus pathophysiologischer Sicht zeigt der Großteil der CRSwNP-Patienten das Bild einer Typ-2 Inflammation (AGARWAL et al., 2020). Die Typ-2 Inflammation ist durch die Interleukine-4, -5 und -13 charakterisiert und beinhaltet die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Klinische Studien konnten zeigen, dass Patienten mit einem schwachen Typ-2 Endotyp weniger erfolgreich auf die Therapie der CRS ansprechen (FOKKENS et al., 2020). Dies ist durch den verlängerten Heilungsprozess durch unzureichende Rekrutierung von Interleukinen zu erklären. Gegenstand aktueller Forschung ist nun, die entsprechenden molekularen Biomarker der Typ-2 Reaktion in der Therapie zu nutzen, um so eine personalisierte und zielgerichtete („targeted“) Therapie zu ermöglichen. Bisher gibt es keinen genetischen Marker, den man zur Diagnose heranziehen kann und der mit guter Zuverlässigkeit das individuelle Risiko, eine Typ-2 Inflammation zu entwickeln, anzeigt (ROBINSON et al., 2017).

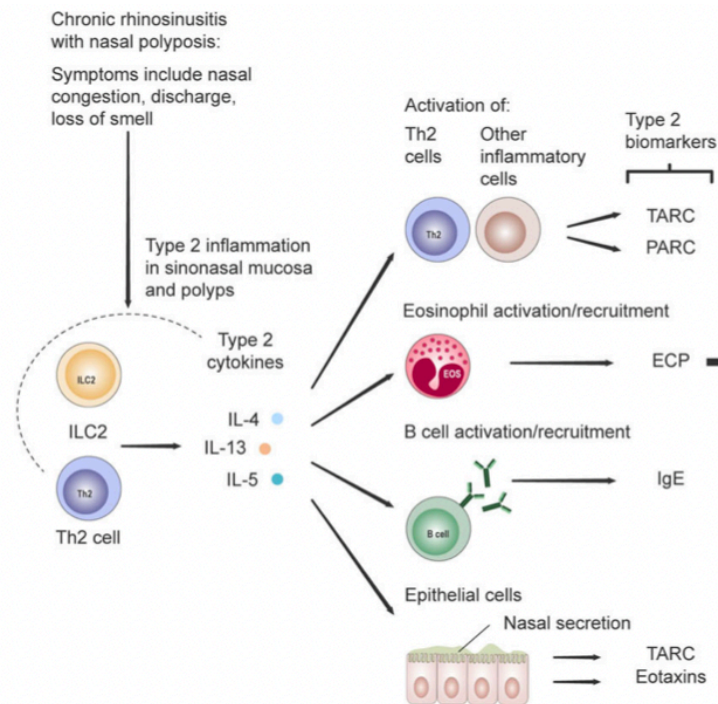
### 2.2.2 Molekulare Pathogenese der CRSwNP

Durch eine chronisch gestörte Barriere des Nasenschleimhautepithels können Pathogene und Allergene leichter in das Epithel eindringen. Die Gründe der gestörten Barriere sind multifaktoriell und teilweise noch ungeklärt, doch man geht von genetischen, epigenetischen und umweltbedingten Einflüssen aus (KERN et al., 2008). Das Gleichgewicht des Epithels wird durch die chronische Entzündung gestört und führt so zu einer geschädigten Integrität der Schleimhaut (s. Abbildung 8) (SCHLEIMER, BERDNIKOVS, 2017).



**Abbildung 8** Ätiologie der Epithelzellschädigung, modifiziert nach (SCHLEIMER, BERDNIKOVS, 2017). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Als Reaktion darauf werden spezielle T-Helferzellen, sog. TH2-Zellen, aktiviert, die Interleukine (IL) ausschütten und weitere Prozesse aktivieren (s. Abbildung 9) (AGARWAL et al., 2020; GANDHI et al., 2016).



**Abbildung 9** Molekulare und zellphysiologische Grundlagen der chronisch-polypösen Rhinosinusitis, modifiziert nach (JONSTAM et al., 2019); Nähere Erläuterungen siehe Text.

In erster Linie sind diese Typ-2 Zytokine die Interleukine-4, -5 und -13 (JONSTAM et al., 2019; WANG et al., 2016). Dadurch kommt es zu einem Remodeling der Schleimhaut und zur Ausbildung von Polypen (KATO, 2015). Eine Zellhyperplasie der Becherzellen wird vor allem durch die Interleukine-4 und -13 ausgelöst und führt zu einer vermehrten Produktion von zähem Sekret (GANDHI et al., 2016; RAMANATHAN et al., 2008). Nebenbei sei hier angemerkt, dass die Interleukine-4 und -13 eine starke strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, die sich in einer vergleichbaren Funktion und einem geteilten Rezeptor widerspiegelt. Diese beiden Interleukine sind auch für die vermehrte Ausreifung der B-Zellen verantwortlich, wodurch eine erhöhte Zahl an Immunglobulin E (IgE) produziert wird (KATO, 2015; SETTIPANE et al., 2013). Außerdem induzieren sie die Expression des „Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), welcher für die Adhäsion von Eosinophilen durch den „Very late antigen 4“-Rezeptor (VLA-4) verantwortlich ist (AGARWAL et al., 2020; HO et al., 2015). So kommt es zu einer vermehrten Adhäsion und Migration von Eosinophilen aus den Gefäßen zum nasalen Gewebe (AGARWAL

et al., 2020; FULKERSON, ROTHENBERG, 2013; RANKIN et al., 2000). Durch die Schädigung der Tight Junctions kommt es zu weiteren Barriere-Störungen, die den Krankheitsprozess begünstigen (WISE et al., 2014). Außerdem induzieren beide Interleukine die Sekretion der beiden Th2-Biomarker TARC (tymus and activation-regulated chemokine) und PARC (pulmonary and activation-regulated chemokine).

In 70-90 % der CRSwNP-Patienten aus Europa und den USA konnte außerdem eine Eosinophilie, also ein erhöhter prozentualer Anteil an eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut, nachgewiesen werden (HO et al., 2015; KATO, 2015). Es ist anzumerken, dass aus unbekanntem Gründen in der asiatischen Bevölkerung überwiegend nicht-eosinophile CRSwNP zu finden sind (WANG et al., 2014). Auffällig ist außerdem, dass vor allem Allergie-Patienten eine erhöhte Ausschüttung von Interleukin-5 aufweisen (KATO, 2015). Interleukin-5 wiederum ist ein entscheidendes Zytokin bezüglich des Überlebens der eosinophilen Granulozyten (KATO, 2015).

Diese Ausführungen zeigen, wie komplex die molekularen Mechanismen sind, die zu einer CRSwNP führen und diesen Krankheitsprozess aufrechterhalten. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse wird entscheidend sein, um weitere Ansätze für eine zielgerichtete Therapie zu finden und die richtigen Patienten für diese Therapieansätze auf der Basis eines molekularen, prädiktiven Markerpanels auszuwählen.

### 2.2.3 Diagnostik, Therapie und klinisches Management von CRSwNP-Patienten

In der Diagnostik der akuten wie auch der chronischen CRS steht die klinische Erhebung der Symptome (s.2.1.2) im Vordergrund (STUCK et al., 2018). Nur bei persistierenden Symptomen, geplanter operativer Therapie oder Auftreten von Komplikationen wird eine weiterführende Diagnostik empfohlen (FOKKENS et al., 2020). Um die Lebensqualität (health-related quality-of-life, HRQL) der betroffenen Patienten messbar zu machen, gibt es mehrere Verfahren (patient reporting outcome measures, PROMS). Einer davon ist der SNOT-22 Fragebogen (Sino-Nasal Outcome Test), der von den Patienten ausgefüllt wird und Aussagen über den krankheitsspezifischen Gesundheitsstatus und die gesundheitsbezogene Lebensqualität gibt. Je höher der Endwert ist, desto höher ist die Einschränkung der Lebensqualität (J. BOCK, 2018). Die meisten PROMS decken jedoch nicht das gesamte Spektrum der Symptome ab. So versagt beispielweise der SNOT-22 Fragebogen darin, die Dauer der Medikamenteneinnahme zu be-



stimmen (BAUMANN, 2009). Dennoch wird der SNOT-22 in Kombination mit dem endoskopisch zu bestimmenden Lund-Kennedy Score und zusätzlicher Anamneseerhebung in den aktuellen Leitlinien und Positionspapieren der Fachgesellschaften für Rhinosinusitis-Patienten empfohlen (BAUMANN et al., 2007; FOKKENS et al., 2020; HOPKINS et al., 2009). Ein weiteres Messinstrument ist der „Short Form 36 Health Survey (SF-36), welcher aus 36 Einzelfragen besteht und weltweit der am häufigsten eingesetzte Fragebogen zur Messung der allgemeinen gesundheitsbezogenen, jedoch nicht spezifisch an die nasale Funktion gebundene, Lebensqualität ist (GARRATT et al., 2002). Die bereits erwähnte endoskopische Untersuchung stellt einen weiteren wichtigen Diagnoseschritt dar, um die Polypengröße zu bestimmen (s. Abbildung 1) (AGARWAL et al., 2020). Eine Computertomographie der Nasennebenhöhlen ohne die Gabe von Kontrastmittel ist in der radiologischen Evaluation der aktuelle Goldstandard (HIRSCH et al., 2017). Bei Kindern und Schwangeren kann als Alternative auch auf eine digitale Volumentomographie (DVT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) zurückgegriffen werden. Der meist angewendete und validierte Score zur Befundung der Schnittbildgebung hinsichtlich des Schweregrades einer sinunasalen Entzündung ist der Lund-Mackay Score (LMS), welcher Werte bis 24 (12 pro Seite) annehmen kann. Je niedriger der Wert ist, desto besser ist der negative prädiktive Wert (NPV) für das Fehlen einer ARS/CRS. Um eine Allergie der oberen Atemwege zu diagnostizieren, wird als initiales Screening ein Prick-Test empfohlen und/oder der Gesamt-Serum-IgE Wert bestimmt. Fakultativ können im weiteren Verlauf Allergen-spezifische IgE-Antikörper-Titer mittels RAST (Radio-Allergo-Sorbent Test) bestimmt werden. Auch Riechtests zur subjektiven Olfaktometrie, beispielsweise unter Verwendung der European Sniffin' Sticks (s. 3.8 *Olfaktometrie*), werden im diagnostischen work-up der CRS-wNP empfohlen. Eine histologische Diagnose steht aktuell noch nicht im Vordergrund, wird aber vermutlich zukünftig an Bedeutung gewinnen, um den Endotyp der Entzündung zu bestimmen und eine zielgerichtete Therapie, zum Beispiel mit Biologika, zu ermöglichen (AKDIS et al., 2013; DE GREVE et al., 2017; ORLANDI et al., 2021; STEVENS et al., 2016).

In der Erstlinientherapie der CRSwNP wird zunächst das regelmäßige Nasenspülen mit physiologischer Kochsalzlösung, Inhalationen und die Anwendung von topischen Steroiden in Form von cortisonhaltigen Nasensprays, beispielsweise mit dem Wirkstoff Mometason (SMALL et al., 2005), über einen Zeitraum von mindestens 4-6 Wochen empfohlen (s. Abbildung 10) (ORLANDI et al., 2021).

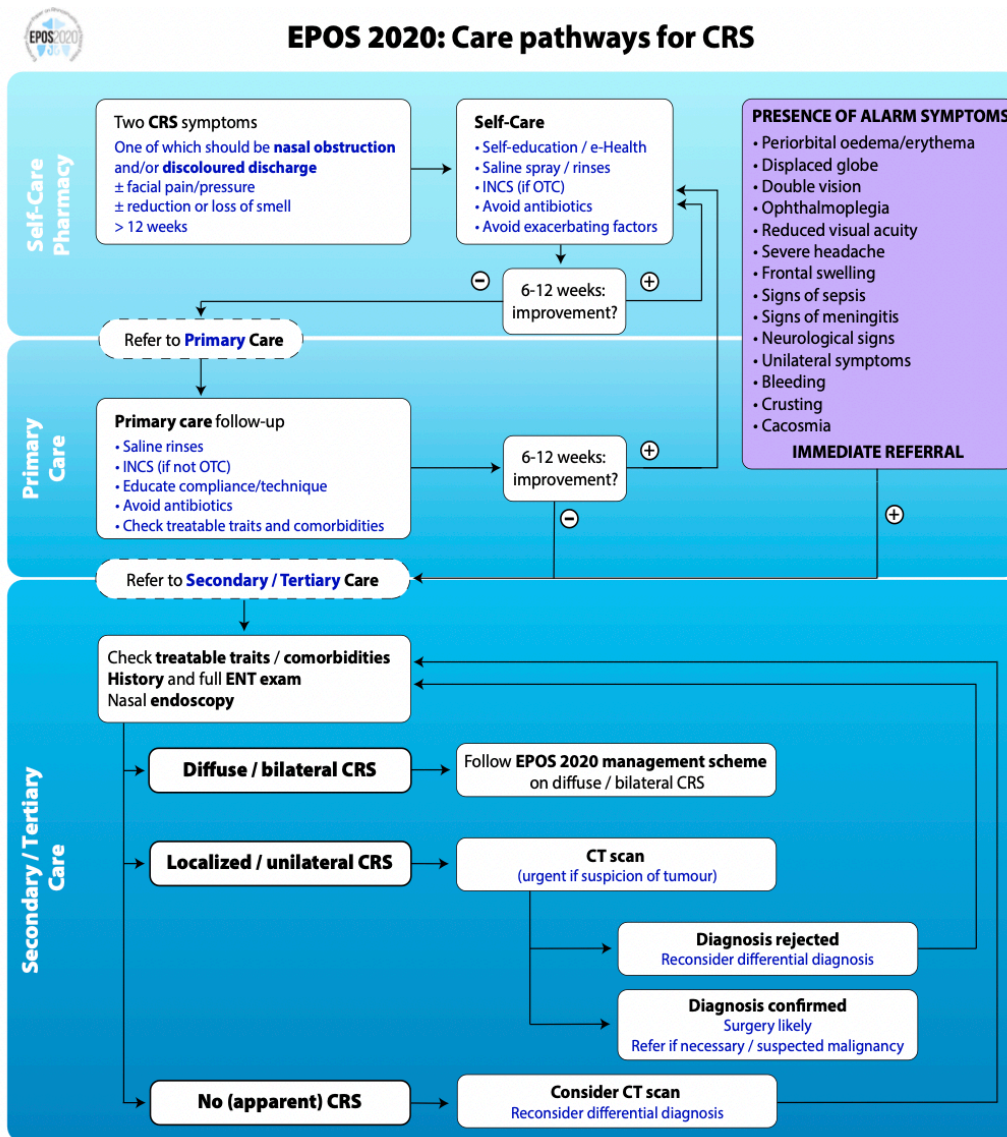


Abbildung 10 Therapie und Empfehlungen für Erwachsene Patienten mit CRS nach EPOS 2020, (FOKKENS et al., 2020), CRS: chronic rhinosinusitis; CT, computed tomography; INCS, intranasal corticosteroids spray; OTC, over-the-counter.

Diese Maßnahmen unterstützen die Schleimhaut dabei sich zu beruhigen und abzuswellen, festsitzende Pathogene herauszuspülen und durch Cortison die reaktive und/oder endogene Entzündungsreaktion zu unterdrücken. Zudem sollte in regelmäßigen Abständen der Therapieerfolg überprüft werden, exazerbierende Faktoren eruiert und vermieden sowie eine Aufklärung bzgl. eines Übergebrauchs von Antibiotika durchgeführt werden (ORLANDI et al., 2021).

Bei Fortbestehen der Symptomatik nach dieser konservativen Therapie für 4-6 Wochen sollte die Diagnostik weitergeführt und Komorbiditäten ausgeschlossen werden. Bei lokalen/ unilateralen Polypen wird bei Versagen der konservativen Therapie in der Regel eine Operation empfohlen (HELLINGS et al., 2013). Entsprechend des heutigen Goldstandards handelt es sich dabei um eine endonasal-endoskopische Nasennebenhöhlenoperation (Functional Endoscopic

Sinus Surgery, FESS). Das entzündliche Gewebe kann dadurch entfernt und die Obstruktion beseitigt werden, damit die Medikamenten besseren Zugang zur Schleimhaut haben und es zu einem Abheilen des Entzündungsprozesses kommt (KIM et al., 2021). Auch nach der Operation ist eine Fortführung der topischen Steroidtherapie von entscheidender Bedeutung für den letztlichen Therapieerfolg (DECONDE et al., 2017). Bei der diffusen/ bilateralen CRS ist eine Operation (FESS) weniger erfolgsversprechend, häufig jedoch nicht zu vermeiden (s. Abbildung 11).

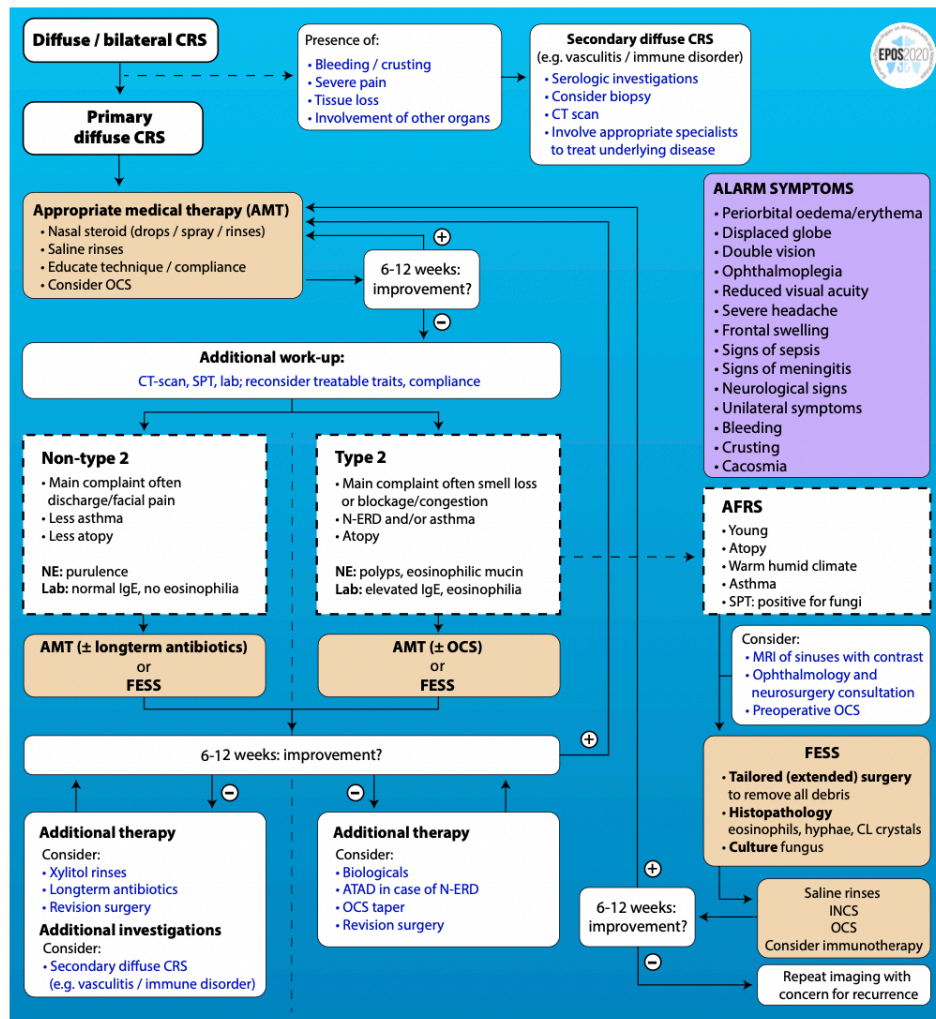


Abbildung 11 EPOS 2020 Management Schema der diffusen CRS, (FOKKENS et al., 2020), AMT, appropriate medical therapy; ATAD, Aspirin treatment after desensitisation; CRS, chronic rhinosinusitis; CT, computed tomography; FESS, functional endoscopic sinus surgery.

Zusätzlich zu den lokalen Kortikosteroiden, Inhalationen und der Kochsalzlösung kann vor der Indikation zu einer FESS noch eine systemische Steroidtherapie erwogen werden (ALOBID et

al., 2014; ORLANDI et al., 2021). Wegen der erheblichen Nebenwirkungen<sup>1</sup> sind diese aber nicht zur Langzeitanwendung geeignet (HOX et al., 2020). Weitere Maßnahmen sind beispielsweise eine orale Aspirin-Therapie (aspirin treatment after aspirin desensitization (ATAD)) bei Patienten mit einem Samter-Trias/Widal-Syndrom<sup>2</sup> als Ursache der CRSwNP oder eine Gabe von Antibiotika in niedriger Dosierung über mehrere Wochen, wobei bei CRSwNP-Patienten die Anwendung von Doxycyclin empfohlen wird (KLIMEK et al., 2014; RUDMIK, SOLER, 2015; STEVENS et al., 2017).

Allerdings zeigen diese Verfahren häufig nur eine kurzzeitige Besserung der Symptome, die Rezidivrate bleibt bei CRSwNP-Patienten trotz Therapie hoch (DECONDE et al., 2017). Bis zu 60 % aller CRSwNP-Patienten entwickeln im weiteren Verlauf auch nach chirurgischer Therapie ein behandlungsbedürftiges Rezidiv (DECONDE et al., 2017; ROSATI et al., 2020), so dass bei diesen Patienten nicht selten mehrfache Nasennebenhöhlenoperationen im Krankheitsverlauf notwendig werden. Vor allem Patienten mit Komorbiditäten wie Asthma bronchiale oder Aspirin-Intoleranz neigen zur Entwicklung von Rezidiven (LOFTUS et al., 2020; MENDELSON et al., 2011; ROSATI et al., 2020; STEVENS et al., 2017).

Für CRSwNP Patienten, die ein Rezidiv trotz leitliniengerechter Therapie einschließlich einer FESS entwickeln, welches nicht suffizient durch weitere Operationen und/oder systemische Cortisongaben beherrscht werden kann, kann der Einsatz von Biologika wie Dupilumab als Therapieoption erwogen werden (BACHERT et al., 2021). Auf diese innovative Therapieform, die erst seit wenigen Jahren zur Behandlung von CRSwNP Patienten zur Verfügung steht, wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

---

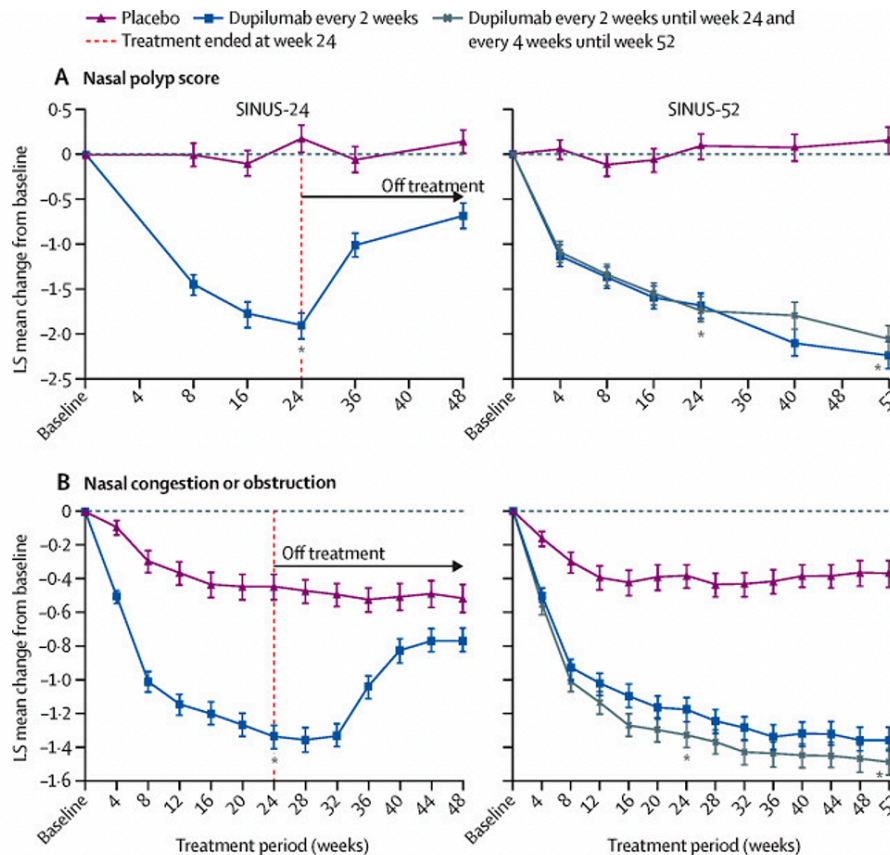
<sup>1</sup> Nebenwirkungen bei langfristiger Anwendung von Steroiden: Übergewicht, Osteoporose, Frakturen, erhöhtes Infektionsrisiko, Glaukom, Schlafstörungen, Depressionen, Angststörungen etc. (71. Hox V, Lourijen E, Jordens A, Aasbjerg K, Agache I, Alobid I, Bachert C, Boussery K, Campo P, Fokkens W, Hellings P, Hopkins C, Klimek L, Makela M, Mosges R, Mullol J, Pujols L, Rondon C, Rudenko M, Toppila-Salmi S, Scadding G, Scheire S, Tomazic PV, Van Zele T, Wagemann M, van Boven JFM, Gevaert P (2020) Benefits and harm of systemic steroids for short- and long-term use in rhinitis and rhinosinusitis: an EAACI position paper. Clin Transl Allergy 10:1)

<sup>2</sup> Samter-Trias/Widal-Syndrom: Trias aus Sensitivität gegenüber ASS und anderen NSAIDs, Nasale Polypen und Bronchiales Asthma (79. Klimek L, Dollner R, Pfaar O, Mullol J (2014) Aspirin desensitization: useful treatment for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) in aspirin-exacerbated respiratory disease (AERD)? Curr Allergy Asthma Rep 14:441)

## 2.2.4 Dupilumab

Dupilumab ist ein humaner, monoklonaler Antikörper, der spezifisch die  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-4 Rezeptors über eine direkte Bindung hemmt, und dadurch sowohl das IL-4 als auch das IL-13 Signaling inhibiert (JONSTAM et al., 2019). Diese Signalwege stellen Schlüsselemente der Typ-2-Entzündungsreaktion dar. Die erste Zulassung erhielt Dupilumab durch die Europäische Arzneimittelkommission (EMA) im September 2017 zur Behandlung von Erwachsenen mit mittelschwerer bis schwerer Neurodermitis (BLAUVELT et al., 2017; SHIRLEY, 2017). Im Februar 2019 wurde eine weitere Zulassung der EMA zur Behandlung von Patienten ab 12 Jahren mit schwerem Asthma bronchiale als Add-on Therapie zu inhalativen Kortikosteroiden ausgesprochen (CASTRO et al., 2018; WENZEL et al., 2013). Bei beiden Erkrankungen stellt wie auch bei der CRSwNP eine chronische Typ-2-Entzündung den wesentlichen molekularen Krankheitsmechanismus dar (SHIRLEY, 2017). Grundlage der Zulassung einer Therapie von CRSwNP-Patienten mit Dupilumab waren zwei multizentrische, randomisierte, Placebo-kontrollierte Doppelblind-Studien (LIBERTY NP SINUS-24 und LIBERTY NP SINUS-52), deren Ergebnisse im Journal *Lancet* im Jahr 2019 publiziert wurden (s. Abbildung 12) (BACHERT et al., 2019). In den beiden Phase-3-Studien wurden insgesamt 724 CRSwNP-Patienten rekrutiert und in eine Dupilumab-Behandlungsgruppe sowie eine Placebo-Gruppe randomisiert. Eingeschlossen wurden mindestens 18-jährige CRSwNP-Patienten, die Krankheitssymptome trotz topischer Steroidbehandlung zeigten und in den zurückliegenden 2 Jahren entweder eine systemische Steroidtherapie oder eine Nasennebenhöhlenoperation benötigt hatten. In der SINUS-24 Studie erhielten die Patienten entweder (1:1 Randomisierung) 300mg Dupilumab subkutan oder Placebo subkutan alle 2 Wochen für insgesamt 24 Wochen. In der SINUS-52 Studie erhielten die Patienten entweder (1:1:1 Randomisierung) 300mg Dupilumab subkutan alle 2 Wochen für 52 Wochen oder 300mg Dupilumab subkutan alle 2 Wochen für 24 Wochen und dann für weitere 28 Wochen alle 4 Wochen oder Placebo alle 2 Wochen für 52 Wochen. Alle Patienten führten die topische Steroidbehandlung mit einem cortisonhaltigen Nasenspray fort. Als primäre Endpunkte wurden die Veränderung des nasalen Polypenscores nach 24 Wochen Therapie und die Veränderung der nasalen Obstruktion nach 24 Wochen definiert. Bei sehr guter Verträglichkeit des Medikaments zeigte sich letztlich für beide primären Endpunkte eine signifikante Verbesserung nach 24 Wochen Therapie mit Dupilumab verglichen mit Placebo (s. Abbildung 12). So zeigten 46 % der Patienten eine Verbesserung hinsichtlich des nasalen Polypenscores um mindestens zwei Punkte (BACHERT et al., 2019). Weiterhin waren eine Verbesserung der Riechfähigkeit, der Symptome und der Lebensqualität

sowie die reduzierte Notwendigkeit von oraler Steroidgabe und FESS zu beobachten (BACHERT et al., 2019).

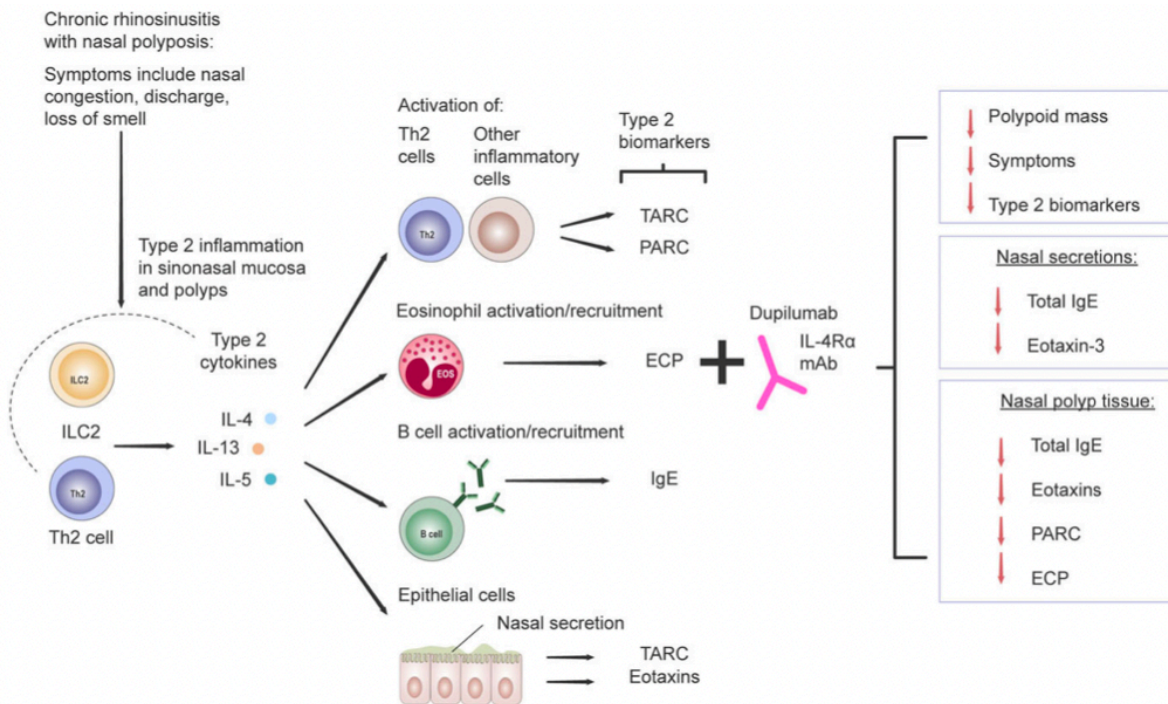


**Abbildung 12 Therapieeffekt einer systemischen Dupilumab-Therapie bei Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinuitis in der SINUS-24- und SINUS-52-Studie.** (A) Veränderung des nasalen Polypenscores unter Dupilumab (blaue Linie) bzw. Placebo (violette Linie). (B) Veränderung der Nasenatmungsbehinderung unter Dupilumab (blaue Linie) bzw. Placebo (violette Linie). LS – least squares. *Abbildung modifiziert aus Bachert et al. 2019.*

Es zeigte sich dabei im Vergleich des 24-Wochen-Therapiearms und des 52-Wochen-Therapiearms in der SINUS-52-Studie, dass ein Absetzen der Therapie nach 24 Wochen mit einer erneuten Zunahme der Beschwerden und einem erneuten Polypenwachstum einhergeht, so dass eine Behandlung von CRSwNP-Patienten mit Dupilumab nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft eine Dauertherapie darstellt. Als Folge dieser Studienergebnisse wurde Dupilumab zur Behandlung von CRSwNP-Patienten, deren Krankheitsbild nicht ausreichend entweder durch systemische Steroide oder Nasennebenhöhlen-Operationen kontrolliert werden kann, als Add-On-Therapie zusätzlich zur topischen Steroidbehandlung mit cortisonhaltigem Nasenspray in Form einer subkutanen Injektion alle 2 Wochen im Oktober 2019 durch die europäische Arzneimittelkommission zugelassen.

In Abbildung 13 ist der Wirkmechanismus von Dupilumab bildlich veranschaulicht. Der Antikörper hemmt die Typ-2 Inflammation und damit einhergehend die IgE Produktion und die

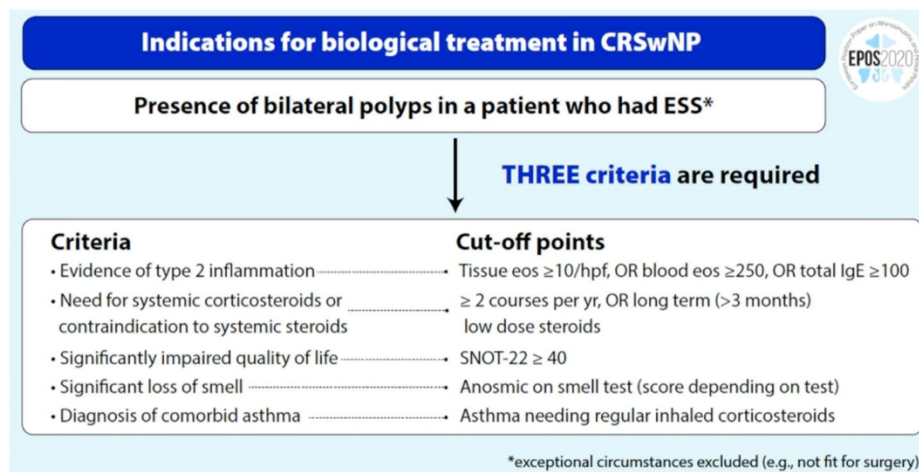
Eosinophilie (HH et al., 2020). So wird das Remodelling und die vermehrte Schleimbildung unterdrückt (HH et al., 2020). Sowohl die Symptome der Patienten als auch die Typ-2-Biomarker im Blut nehmen dadurch unter Dupilumab-Therapie ab (JONSTAM et al., 2019).



**Abbildung 13** Wirkmechanismus des Antikörpers Dupilumab, modifiziert nach (JONSTAM et al., 2019); nähere Erläuterungen siehe Text.

Die aktuellen EPOS-Empfehlungen zur Indikation einer Dupilumab-Therapie in Ergänzung zu den durch die EMA vorgegeben bedingt verpflichtenden Indikationskriterien sind in Abbildung 14 veranschaulicht. Patienten, die bilaterale Polypen aufweisen und bereits eine operative Therapie in Form einer FESS hatten beziehungsweise nicht fit genug für eine Operation waren, sollten drei der folgenden Kriterien erfüllen, um sich für eine Dupilumab-Therapie zu eignen (FOKKENS et al., 2020): Es muss eine Typ-2 Inflammation vorliegen (RAMPI et al., 2022). Diese kann durch eine Eosinophilie im Blutbild von  $\geq 250$  Zellen/ $\mu\text{l}$  oder Serum-IgE Werten  $\geq 100$  IU/ml nachgewiesen werden. Ein weiteres Kriterium ist der Einsatz von systemischen Kortikosteroiden von  $\geq 2$ -mal pro Jahr oder eine Langzeitnutzung über mehr als drei Monaten. Kontraindikationen für eine systemische Kortikosteroidtherapie werden ebenfalls als Kriterium akzeptiert. Das dritte Kriterium ist eine signifikante Einschränkung der Lebensqualität, was beispielweise durch einen Score  $\geq 40$  im SNOT-22 Fragebogen nachgewiesen werden kann.

Ein eingeschränktes Riechvermögen und die Diagnose eines Asthma bronchiale zählen ebenfalls zu den Kriterien. Klimek et al. veröffentlichten 2020 ein Dokument zur Orientierung für Fachärzte, um die Indikation einer Dupilumab-Therapie bei CRSwNP evidenzbasiert stellen zu können (s. 9.1 Anhang) (KLIMEK et al., 2020).



**Abbildung 14 Indikationen einer Biologika Therapie bei CRS nach EPOS 2020, modifiziert nach (FOKKENS et al., 2020),** CRS, chronic rhinosinusitis; CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyps; ESS, endoscopic sinus surgery; hpf: high power field (x400); SNOT-22, sino-nasal outcome test-22.

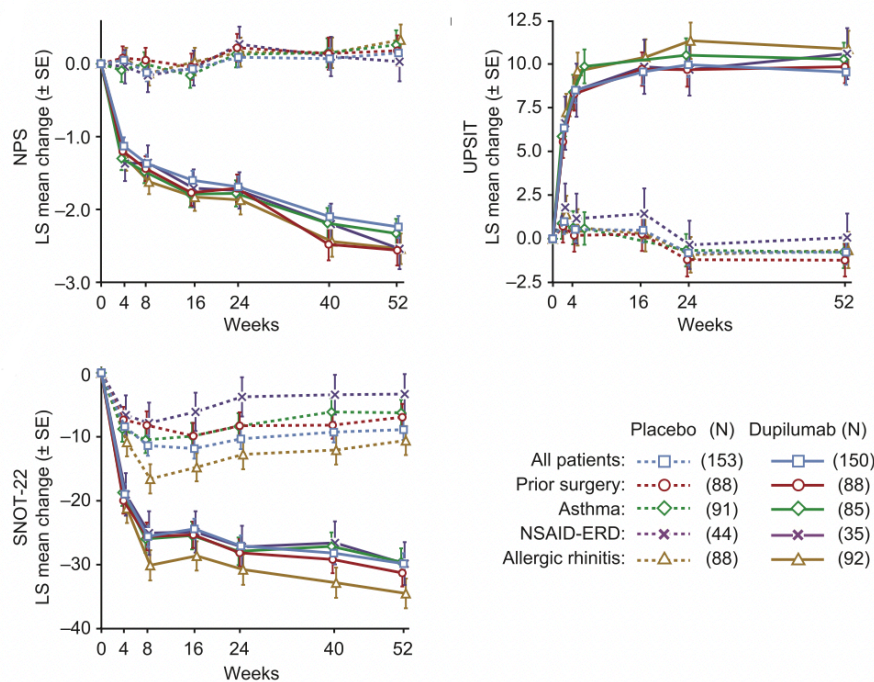
Die Tatsache, dass in dem EPOS 2020 Papier eigene Kriterien entwickelt wurden, um geeignete Patienten für eine Dupilumab Therapie auszuwählen, zeigt, dass ein reines Erfüllen der Zulassungskriterien der EMA nicht ausreichend für eine zielgerichtete und effektive Patientenselektion erscheint. Zusätzliche Kriterien bzw. Marker sind erforderlich, um die wirklich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von dieser Therapie profitierenden Patienten auszuwählen. Auch angesichts der enorm hohen Kosten der Dupilumabtherapie (ca. 20.000 Euro pro Patient und Jahr) wird die korrekte Patientenselektion in Zukunft von entscheidender Bedeutung sein.

Die Wirksamkeit von Dupilumab bei CRSwNP Patienten wurde in mehreren weiteren Studien nachgewiesen, wie beispielweise das State of the Art Review von Kim et al. zeigt (BACHERT et al., 2019; HH et al., 2020; HOFFMANN et al., 2022; JONSTAM et al., 2019; KIM et al., 2021). Abbildung 15 zeigt den Verlauf verschiedener Parameter im Laufe der SINUS-52 Studie und veranschaulicht dabei sehr gut, dass vor allem Patienten von der Dupilumab-Therapie profitieren, die vor kurzem eine Operation hatten oder die Komorbiditäten Asthma, NSAID-ERD<sup>3</sup> oder allergische Rhinitis aufweisen (HELLINGS et al., 2022). Man erkennt außerdem, dass der

<sup>3</sup> NSAID-ERD/ N-ERD: Nonsteroidal anti-inflammatory drug exacerbated respiratory disease



Unterschied im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant ist und dass die Wirkung des Antikörpers sehr schnell nach Therapiebeginn Eintritt (HELLINGS et al., 2022).



**Abbildung 15** Veränderung der Werte der CRSwNP-Patienten bis Woche 52 der SINUS-52 Studie, modifiziert nach (HELLINGS et al., 2022), LS, least squares; NSAID-ERD, nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease; SNOT-22, 22-item Sino-Nasal outcome Test.

Mehrere Studien zeigen, dass Dupilumab nicht nur erfolgreich wirkt, sondern auch eine gute Anwendbarkeit und Verträglichkeit bei geringem Nebenwirkungsprofil zeigt (BACHERT et al., 2019; HOFFMANN et al., 2022; SAKMEN et al., 2022; SEUTHE et al., 2022). Die am häufigsten berichteten Nebenwirkungen waren Fälle von Nasopharyngitis, Reaktionen an der Injektionsstelle (z.B. Rötungen, Schwellungen und Juckreiz), Überempfindlichkeitsreaktionen bis hin zu einem allergischen Schock und Kopfschmerzen (BACHERT et al., 2016; ORLANDI et al., 2021). Zudem wurden Fälle einer Eosinophilie häufig ( $\geq 1/100$ ,  $< 1/10$ ) beschrieben (AEDA, 2019; BACHERT et al., 2021; SANOFI, 2022). Bei Patienten mit atopischer Dermatitis wurden unter Dupilumab-Therapie Fälle von systemischen Überempfindlichkeitsreaktionen und Konjunktividen beschrieben (KLIMEK et al., 2020). Bei Asthma Patienten wurden eosinophile Pneumonien und Vaskulitiden beobachtet (MENZELLA et al., 2019; SANOFI, 2022). Da eine eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA) eine Differentialdiagnose der schweren CRSwNP ist, muss bei einer Eosinophilie von mehr als 10 % besonders auf Nebenwirkungen wie vaskulitische Hautausschläge, Verschlechterung der Lungensymptomatik,

Neuropathie und kardiale Komplikationen geachtet werden (KLIMEK et al., 2020). Kontraindikationen sind aufgrund der fehlenden Datenlage Schwangerschaft, Stillzeit sowie schwere Nieren- beziehungsweise Leberfunktionsstörungen (AEDA, 2019; KLIMEK et al., 2020). In diesen Fällen muss die Indikationsstellung sorgfältig mit dem behandelnden Arzt/ der behandelnden Ärztin abgewogen und individuell diskutiert werden (SANOFI, 2022).

Wurde die Indikation zu einer Dupilumab-Therapie bei CRSwNP gestellt, sollte in regelmäßigen Abständen evaluiert werden, wie und ob die Antikörper-Therapie wirkt (s. Abbildung 16) (FOKKENS et al., 2019; KLIMEK et al., 2020). Man spricht von einem Ansprechen der Therapie, wenn sich die Polypengröße reduziert, der Bedarf an systemischen Steroiden abnimmt, sich die Lebensqualität und das Riechvermögen verbessern und die Auswirkungen der Komorbiditäten abnehmen. Bei keinem ausreichenden Ansprechen sollte die Antikörper-Therapie abgebrochen und entweder eine Operation oder der Wechsel auf ein alternatives Biologikum erwogen werden (s. Abbildung 16 und Abbildung 17) (BACHERT et al., 2021).

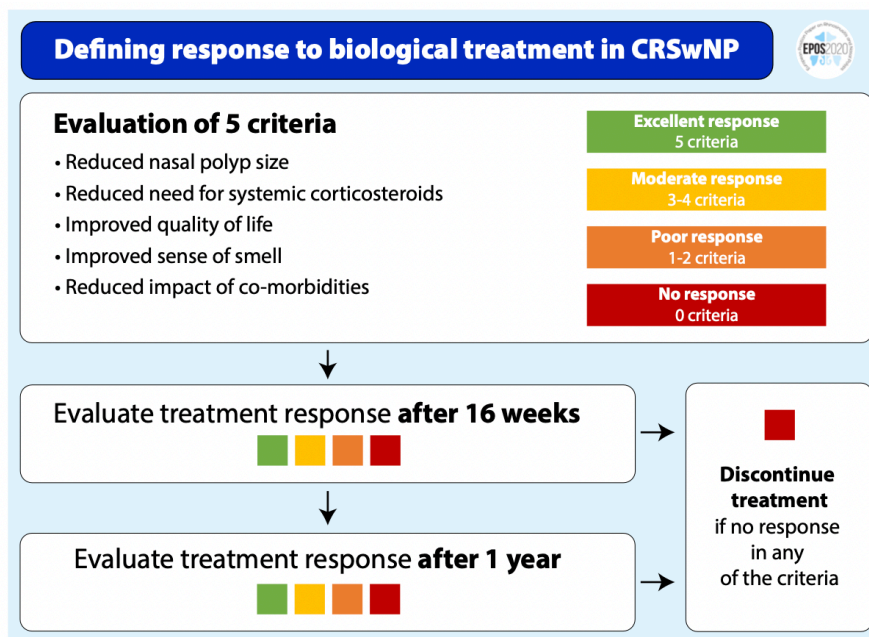
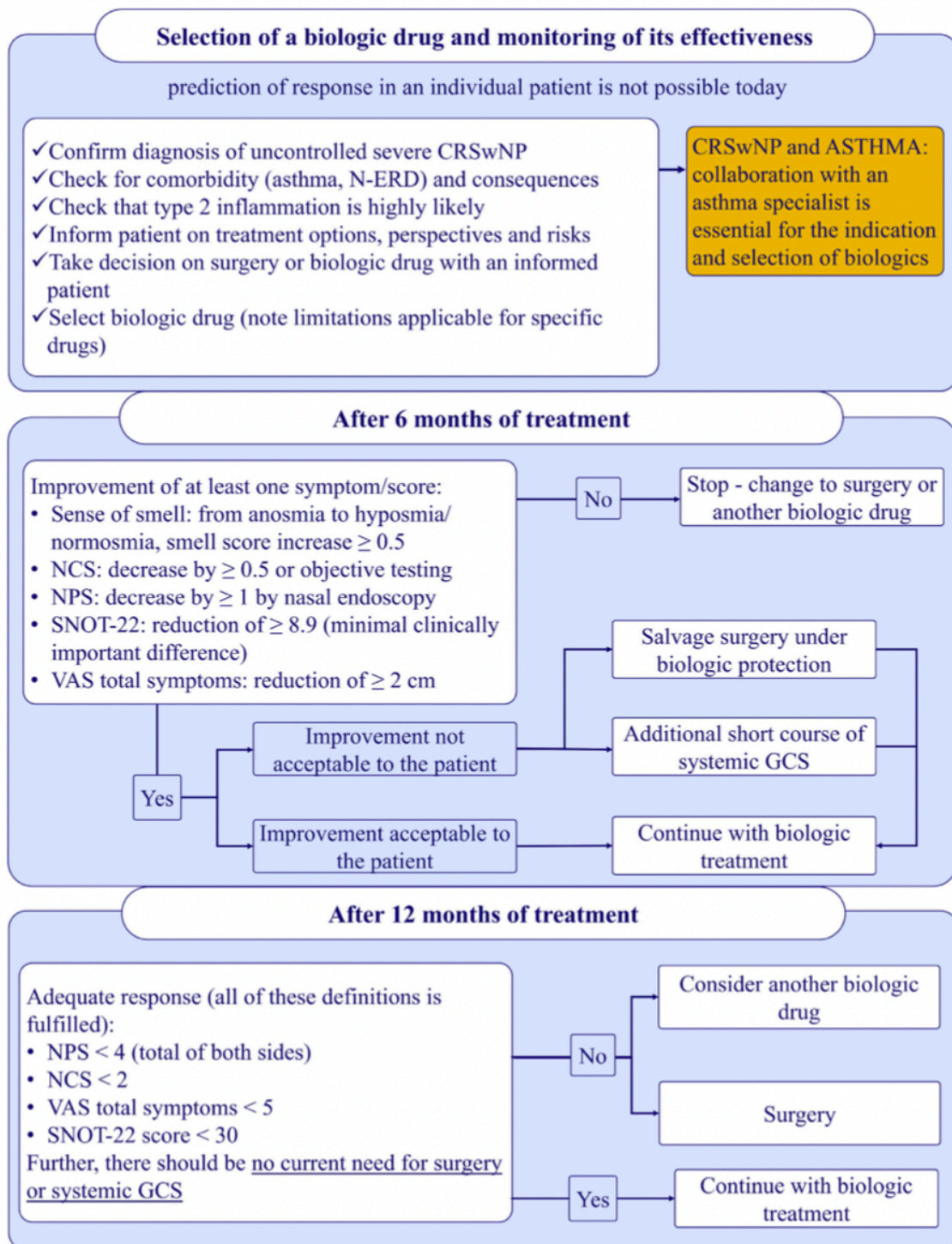


Abbildung 16 Ansprechkriterien der Biologika Therapie bei CRSwNP nach EPOS 2020, modifiziert nach (FOKKENS et al., 2020); Erläuterungen siehe Text.



**Abbildung 17 Monitoring bei Dupilumab-Therapie, modifiziert nach (BACHERT et al., 2021);** CRSwNP, chronic rhinosinusitis with nasal polyps; N-ERD, nonsteroidal anti-inflammatory drug-exacerbated respiratory disease; NCS, nasal congestion score; NPS, nasal polyp score; SNOT-22, 22-item Sino-Nasal Outcome Test; VAS, visual analog scale; GCS, glucocorticosteroid.

### 2.2.5 Weitere Biologika in der Therapie der CRSwNP

Seit der Zulassung von Dupilumab 2019 wurden zwei weitere Biologika in der Therapie der CRSwNP zugelassen (BORISH et al., 2022; KOSKI et al., 2022):

Omalizumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der frei zirkulierende Immunglobuline der Klasse E bindet und dadurch deren Signaling und biologische Effekte inhibiert (AGARWAL et al., 2020). Die erste Zulassung erlangte Omalizumab 2003 für Patienten, die unter einem therapieresistenten Asthma leiden (AGARWAL et al., 2020; BUSSE et al., 2001). Auch für den Einsatz bei unkontrollierter, chronisch idiopathischer Urtikaria folgte die Zulassung (PFAAR et al., 2021). In den folgenden Jahren wurde beobachtet, dass der Einsatz des Antikörpers auch zu einer Reduktion der nasalen Polypen bei Asthma-Patienten und zu einem reduzierten Einsatz von intranasalen kortisonhaltigen Nasensprays führt (PENN, MIKULA, 2007). Omalizumab ist seit 2020 auch als Add-on Therapie der CRSwNP basierend auf den beiden Phase III Studien POLYP 1 und POLYP 2 mit den gleichen Indikationskriterien wie Dupilumab zugelassen (GEVAERT et al., 2020).

Mepolizumab ist ein humaner Anti-IL-5 Antikörper, der 2015 das erste Mal zur Add-on Therapie bei Patienten mit schwerem Asthma vom eosinophilen Phänotyp zugelassen wurde (ORTEGA et al., 2014). Die Wirkung besteht darin, die Differenzierung und das Überleben von Eosinophilen zu verhindern (AGARWAL et al., 2020). Auch im Einsatz gegen nasale Polypen konnte eine Wirkung beobachtet werden, die vor allem eine Reduktion der Polypengröße und die Symptomreduktion betrifft (GEVAERT et al., 2011). Die Notwendigkeit von Nasennebenhöhlen-Operationen nahm unter einer Antikörpertherapie mit Mepolizumab ebenfalls signifikant ab (BACHERT et al., 2017; HAN et al., 2021). Seit der Veröffentlichung der Phase III Studie SYNAPSE im Jahr 2021 ist Mepolizumab ebenfalls als Add-on Therapie bei therapie-refraktärer CRSwNP zugelassen (HAN et al., 2021).

Abbildung 18 fasst die Targets der drei genannten Antikörper bildlich zusammen.

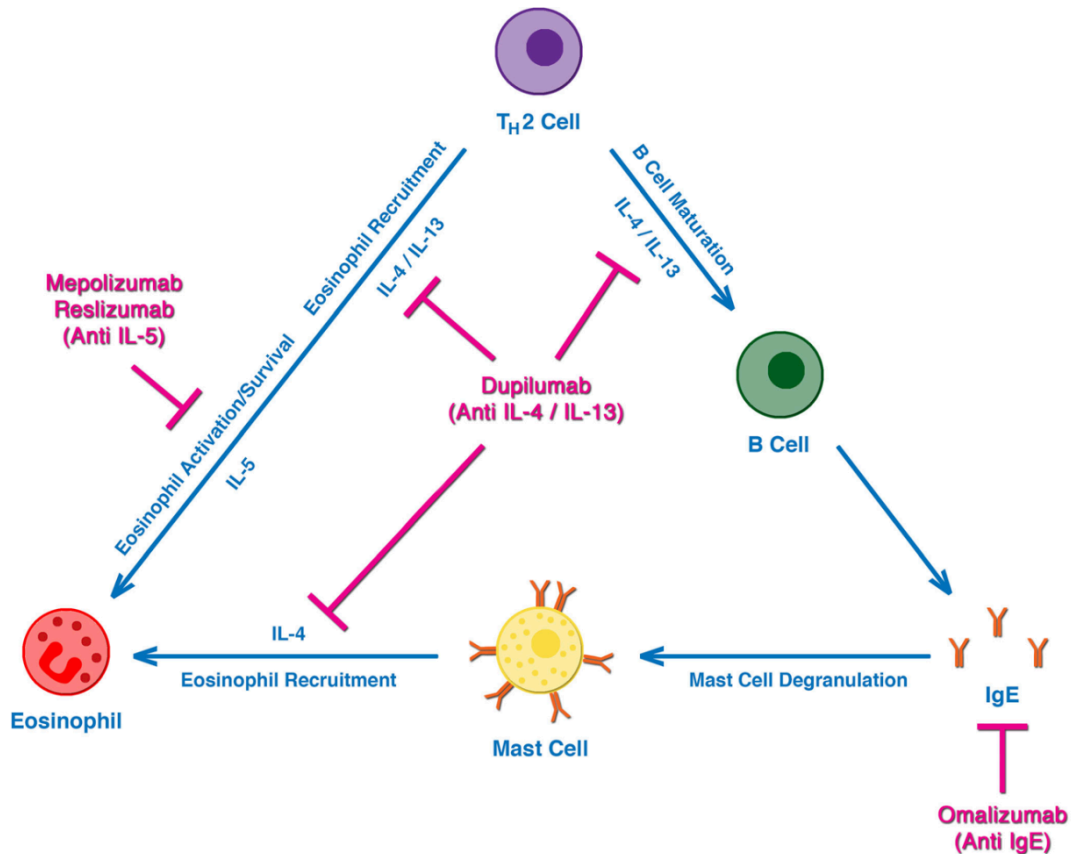



Abbildung 18 Zusammenfassung der Pathophysiologie und Targets der monoklonalen Antikörper bei Nasalen Polypen, modifiziert nach (AGARWAL et al., 2020).

Welche der inzwischen drei zur Behandlung von Patienten mit therapierefraktärer CRSwNP zugelassenen Biologika primär zur Anwendung kommen sollte, ist bisher nicht abschließend geklärt und wird gegenwärtig auch nicht in Studien untersucht. Hier ist es immer eine von verschiedenen Faktoren abhängige Einzelfallentscheidung, die gemeinsam mit dem betroffenen Patienten getroffen werden sollte, um zu klären welches Biologikum primär zum Einsatz kommt.

### 2.2.6 Ziele der Therapie der CRSwNP

Das primäre Ziel der Therapie der CRSwNP ist es, ein Stadium der klinischen Kontrolle zu erreichen, in dem der Patient keine Symptome mehr hat oder die Symptome die Lebensqualität nicht mehr wesentlich einschränken (FOKKENS et al., 2020). In Abbildung 19 wird die Bewertung der klinischen Kontrolle zusammengefasst.



**EPOS 2020: Assessment of current clinical control of CRS (in the last month)**

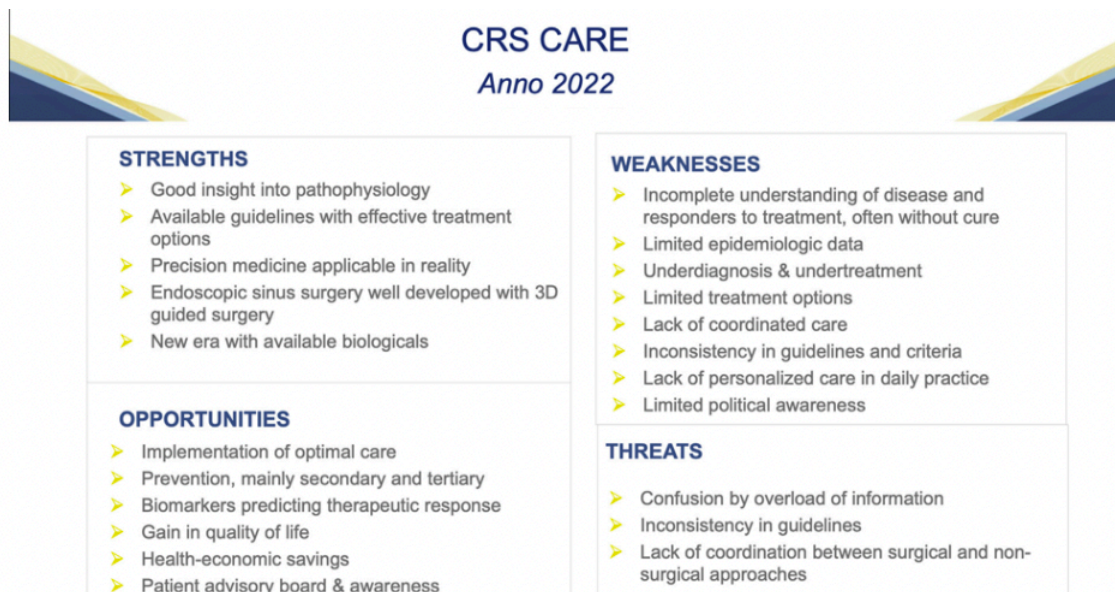
	<b>Controlled</b> (all of the following)	<b>Partly controlled</b> (at least 1 present)	<b>Uncontrolled</b> (3 or more present)
<b>Nasal blockage<sup>1</sup></b>	Not present or not bothersome <sup>2</sup>	Present on most days of the week <sup>3</sup>	Present on most days of the week <sup>3</sup>
<b>Rhinorrhoea / Postnasal drip<sup>1</sup></b>	Little and mucous <sup>2</sup>	Mucopurulent on most days of the week <sup>3</sup>	Mucopurulent on most days of the week <sup>3</sup>
<b>Facial pain / Pressure<sup>1</sup></b>	Not present or not bothersome <sup>2</sup>	Present on most days of the week <sup>3</sup>	Present on most days of the week <sup>3</sup>
<b>Smell<sup>1</sup></b>	Normal or only slightly impaired <sup>2</sup>	Impaired <sup>3</sup>	Impaired <sup>3</sup>
<b>Sleep disturbance or fatigue<sup>1</sup></b>	Not present <sup>2</sup>	Present <sup>3</sup>	Present <sup>3</sup>
<b>Nasal endoscopy</b> (if available)	Healthy or almost healthy mucosa	Diseased mucosa <sup>4</sup>	Diseased mucosa <sup>4</sup>
<b>Rescue treatment</b> (in last 6 months)	Not needed	Need of 1 course of rescue treatment	Symptoms (as above) persist despite rescue treatment(s)

<sup>1</sup> Symptoms of CRS; <sup>2</sup> For research VAS ≤ 5; <sup>3</sup> For research VAS > 5; <sup>4</sup> Showing nasal polyps, mucopurulent secretions or inflamed mucosa

**Abbildung 19** Bewertung der klinischen Kontrolle der CRS nach EPOS 2020, (FOKKENS et al., 2020); CRS, chronic rhinosinusitis; VAS, visual analogue scale.

In Abbildung 20 wiederum sind die Schwächen, Stärken, Möglichkeiten und Gefahren der CRS-Therapie veranschaulicht, die aus der SWOT<sup>4</sup>-Analyse von Hellings stammen (HELLINGS, 2022). Der neue Einsatz von Biologika und die dadurch gewonnene Lebensqualität sind dabei ganz klar als Vorteile genannt. Leider sind allerdings auch viele Schwächen aufgelistet, an denen es in Zukunft noch zu arbeiten gilt (s. Abbildung 20) (HELLINGS, 2022).

<sup>4</sup> SWOT-Analyse: strenght, weakness, opportunities and threat



**Abbildung 20 Überblick über die Stärken, Schwächen, Möglichkeiten und Gefahren der CRS-Therapie, modifiziert nach (HELLINGS, 2022); SWOT, strenght, weakness, opportunities and threat.**

## 2.3 Nasale Abstrichzytologie

Die nasale Abstrichzytologie ist ein diagnostisches Werkzeug, das dazu genutzt werden kann Zellveränderungen des nasalen Epithels zu analysieren und so Aussagen über beispielweise entzündliche Vorgänge zu machen (FERRARA et al., 2012; GELARDI et al., 2007). Zum Vergleich dient dabei das Wissen über die natürliche Zusammensetzung der nasalen Mukosa, die in der Regel aus Flimmerzellen, Becherzellen, und Basalzellen besteht (GELARDI et al., 2007). Das Verhältnis der Flimmerzellen und Becherzellen ist in der Regel 4:1 (GELARDI et al., 2016). Nur selten werden noch basophile Granulozyten und Bakterien beobachtet. So kann das Auffinden von anderen Zellen Aufschluss über mögliche Pathologien geben. Insgesamt ist die nasale Abstrichzytologie jedoch sehr wenig verbreitet und findet in der klinischen Praxis keine relevante Anwendung. Mögliche Gründe sind die hohen Anforderungen an den befundenden Zytologen, die Komplexität der zytologischen Färbungen und ein mangelndes Wissen um die Nutzbarkeit dieser Methode. Dabei bietet die nasale Abstrichzytologie zahlreiche Vorteile sowohl für den behandelnden Arzt als auch den Patienten:

Dieses diagnostische Tool ist einfach anzuwenden und kann als nicht-invasives Verfahren auch bei Bedarf nach Belieben wiederholt werden (FERRARA et al., 2012; GELARDI et al., 2007). Außerdem stellt es ein sehr günstiges Verfahren dar. Die genannten Faktoren ermöglichen somit die Anwendung der Nasenabstriche auch im ambulanten Setting und die Nutzung in allen

Altersklassen (GELARDI et al., 2016). Bereits 1889 wurden erste Versuche mit der nasalen Abstrichzytologie durchgeführt (GELARDI et al., 2007). Man stellte fest, dass Asthma-Patienten eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der Nasenschleimhaut aufweisen (GELARDI et al., 2007). Im Jahre 1927 wies man dieses Phänomen auch bei Allergie-Patienten nach (FERRARA et al., 2012). Seit dem wurden weitere Forschungen betrieben und erkannt, dass die nasale Abstrichzytologie einen relevanten Nutzen in der Rhinologie aufweisen kann. So konnte beispielweise mithilfe der nasalen Abstrichzytologie die nicht-allergische Rhinitis besser unterteilt werden: nicht-allergische Rhinitis mit eosinophilen Zellen (NARES), mit Mastzellen (NARMA), mit neutrophilen Granulozyten (NARNE, neutrophile Granulozyten > 20 %, assoziiert mit physikalischen und chemischen Irritation, Bsp. GER- Gastroösophagealer Reflux) oder gemischten Zellen (NARESMA) (GELARDI et al., 2016). In der klinischen Rhinologie hat sich diese Klassifikation auf Basis der nasalen Abstrichzytologie jedoch nicht durchsetzen können.

Aus technischer Sicht wird empfohlen den mittleren Abschnitt der unteren Nasenmuschel abzustreichen, da dort das Flimmerzellen/Becherzellen-Verhältnis am ehesten ausgeglichen erwartet wird (GELARDI et al., 2016). Als bevorzugte Färbemethode wird die May-Grünwald-Giemsa Färbung gewählt, da mit dieser Färbung die verschiedenen Zelltypen am besten dargestellt werden (FERRARA et al., 2012; GELARDI et al., 2016). Bei einer Infektion nehmen in erster Linie die Flimmerzellen ab und werden durch Becherzellen ersetzt (Becherzellen Metaplasie) (GELARDI et al., 2016). Dadurch lässt sich auch die vermehrte Schleimproduktion im Rahmen einer Infektion erklären. Die Flimmerzellen brauchen in der Regel drei Wochen, um sich wieder zu regenerieren und dies gibt den Bakterien die Chance sich zu vermehren (GELARDI et al., 2016). Bei einem bakteriellen Infekt sind außerdem die neutrophilen Granulozyten vermehrt und Bakterien in der mikroskopischen Auswertung zu erkennen (GELARDI et al., 2016). Bei einer allergischen Rhinitis kann man vermehrt eosinophile Granulozyten und Mastzellen nachweisen (GELARDI et al., 2016). Trotz dieser Erkenntnisse und dem nachgewiesenen, potentiellen klinischen Nutzen findet die nasale Abstrichzytologie aktuell keine routinemäßige Anwendung in der klinischen Praxis. Nur wenige Arbeitsgruppen weltweit beschäftigen sich wissenschaftlich mit der Weiterentwicklung dieser Technik und einer Ausweitung des Anwendungsspektrums (GELARDI et al., 2018b).



## 2.4 Ziele der Arbeit / Fragestellung

Ziel der vorgestellten Arbeit war es, mit der Technik der nasalen Abstrichzytologie die zelluläre Zusammensetzung der nasalen Schleimhaut- und Entzündungszellen bei Patienten mit einer CRSwNP zu untersuchen, die eine systemische Therapie mit dem Antikörper Dupilumab erhalten. Abstrichentnahmen sollten vor Einleitung sowie während der Durchführung der Antikörpertherapie zu mehreren Zeitpunkten erfolgen. Durch die Korrelation der nasalen Differentialzytologie mit dem Therapieansprechen der Patienten sollte so zum einen die diagnostische Wertigkeit der Abstrichzytologie als prädiktiver Marker für ein Ansprechen auf eine Dupilumab-Therapie evaluiert und zum anderen untersucht werden, ob die nasale Abstrichzytologie zum Therapiemonitoring bei dieser Therapieform genutzt werden kann.

In den beiden SINUS-Studien (Dupilumab Zulassungsstudien) zeigte sich bei den eingeschlossenen Patienten eine Ansprechrate hinsichtlich der Verbesserung der klinischen Symptomatik und der Reduktion der Anwendungshäufigkeit systemischer Steroide von ca. 70-75 %, wobei die Patienten in unterschiedlichem Ausmaß profitierten. Daher stellt es auch vor dem Hintergrund der immens hohen Therapiekosten eine wesentliche Herausforderung dar, die Patienten gezielt und möglichst genau identifizieren zu können, die von einer Dupilumab-Therapie profitieren (HH et al., 2020). Nach einheitlicher Meinung der bisher zur Anwendung von Dupilumab in den verschiedenen Indikationen publizierten Studien stellt der Nachweis einer Typ-2 Entzündung den wesentlichen prädiktiven Marker dar, was auch in den Formulierungen der Zulassungsberichte der EMA entsprechend berücksichtigt wird. Bisher stehen hierzu allerdings nur Surrogatparameter wie die Serum-IgE-Konzentration oder aber invasive Untersuchungen wie die histologische Analyse des Polypengewebes zur Verfügung, so dass ein großer Bedarf an einer validen und in der klinischen Praxis einfach anzuwendenden Diagnostik zur Vorhersage des voraussichtlichen Therapieansprechens und zum Therapiemonitoring besteht. Mit der vorliegenden Arbeit soll ein nicht-invasiver und in der klinischen Praxis einfach anzuwendender Test etabliert werden, der zu einem möglichst zielgerichteten und kostensparenden Einsatz von Dupilumab in der Behandlung von CRSwNP-Patienten führen könnte.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 1 Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller	Katalognummer
Entfettete Objektträger mit Mattschild	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik	03-0060
Medscand Cytobrush	Cooper Surgical	C0121
Cell Mark Schreiber	CellPath	MEA-0500-00A
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt	85.1638.235
EDTA K3E/2,7 ml Mono- vetten	Sarstedt	05.1167
Serum-Gel Monovette (4,7 ml)	Sarstedt	0034022
Alkoholisches Hautantiseptiku	Schülke	1582673
May-Grünwald Eosin-Me- thyleneblaulösung modifiziert	Merck KGaA	1.01424.2500
Giemsa Azur-Eosin-Methyl- enblaulösung	Merck KGaA	1.09204.2500
Phosphatpuffer pH 7,2	Herstellung der Apotheke des UKS	
Aqua purificata	UKS Anlage	
Essigsäure 10% Ph. Eur., reinst. aus 100%-iger Essig- säure	Carl Roth GmbH + Co. KG	6755.1

Material und Methoden

Deckgläser	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik	01-2450/1
Entellan Neu	Merck KGaA	1.07961.0500
Xylol	Otto Fischar GmbH + Co. KG	PZN 09208860
Ethanol 99 % vergällt mit MEK + Bitrex + IPA	SAV Liquid Production GmbH	ETO- 5000-99-1
Formaldehyd- Lösung 4,0 % neutral gepuffert	Otto Fischar GmbH + Co. KG	PZN 02653025
Phosphate buffered saline tablet	Sigma- Aldrich Co.	P4417-100TAB
Target Retrieval Solution pH 6,0 (Tris/EDTA- Puffer)	Dako Denmark ApS	S1699
Bovine Serum Albumine	Sigma Life Science	A2153-50G
Anti-Ribonuclease 3/ECP antibody	abcam	EPR20357
Dako Real Detection System Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse	Dako Denmark ApS	K5005
Mayer's Hematoxylin Solu- tion, Sigma Aldrich	MDSS GmbH	MHS-32-1L
GranuloSep™ GSM 1119	HiMedia	LS004-100ML
HiSep™ LSM 1077	HiMedia	LS001-100ML
Röhre 15 ml, 120x17mm, PP	Sarstedt	622.554.502
Phosphate Buffered Saline pH 7,2	Gibco	20012-019
Serologische Pipette	Sarstedt	86.1253.001

Cytospin Filterkarten	Shandon Inc.	190005
Cytospin Küvetten	Shandon Inc.	5991040

### 3.1.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

**Tabelle 2 Chemikalien, Puffer und Lösungen**

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	25 ml Giemsa-Lösung + 225 ml Phosphatpuffer pH 7,2 + 400 µl 10%-ige Essigsäurekonzentrat
Phosphatpuffer pH 7,2	1,63 g Kaliumhydrogenphosphat + 3,2 g Dinatriumhydrogenphosphat + Aqua dest ad 1000 ml (Herstellung der Apotheke des UKS)
10%-ige Essigsäurekonzentrat	1 ml 100%-ige Essigsäure + 9 ml Aqua dest.
Ethanol 95 %	950 ml Ethanol ad 990 ml Aqua dest.
Ethanol 80 %	800 ml Ethanol ad 990 ml Aqua dest.
Ethanol 70 %	700 ml Ethanol ad 990 ml Aqua dest.
PBS pH 7,4	10 PBS-Tabletten ad 2000 ml Aqua dest.
Demaskierungslösung pH 6,0	25 ml Retrieval Puffer 10x konzentriert + 225 ml Aqua dest.
3 % BSA in PBS	3 g Bovines Serum Albumin Granulat ad 100 ml PBS Waschpuffer
1% BSA in PBS	1,7 ml BSA-PBS + 3,3 ml PBS
Chromogenlösung	750 µl Chromogensubstratlösung + 30 µl Chromogen Red 1 + 30 µl Chromogen Red 2 + 30 µl Chromogen Red 3

### 3.1.2 Geräte und zugehörige Software

**Tabelle 3** Geräte und zugehörige Software

Gerät	Firma	Modellnummer, Seriennummer
Reiskocher	Clatronic express cook	RK2925
Thermometer TD11	VWR International bvba	Cat. No. 620-1638
Pipetten (verschiedene Größen)	Tranferpette Firma Brand	100-1000 µl: 21H25699 2-20 µl: 21A01694 0,5-10 µl: 21H30701
Durchlichtmikroskop	Olympus Europa, Hamburg	BX61 Model U-LH100-3 Kamera: Olympus SC30
ProgRes MF Digitalkamera	Jenoptik, Jena; Laser, Optik, Systeme GmbH	S/N: 2407-27-0225
Imaging Software	CellSens Standard	Version 1.12
Magnetrührer	Ikamag	Typ RCT, 318826
Filterpapier	VWR European	Cat. No. 516-0300
Accu-Jet Pro	Brand	20E80514
Zentrifuge (Rotina 380)	Hettich	REF 1701-30 SN 0001738-07
Cytospin 3	Shandon	Cat. No. 74000201 Serial No. MA5459-06V
Statistiksoftware	GraphPad Software, Prism Version 8.4.3	San Diego, CA, USA

### 3.2 Patienten und Studienvisiten

Alle für diese Studie rekrutierten Patienten wurden in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (HNO) des Universitätsklinikums des Saarlandes betreut und behandelt. Patienten, die eine Dupilumab-Therapie bei CRSwNP erhalten, werden in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde im Rahmen der Allergiesprechstunde regelmäßig, in der Regel alle drei Monate, ärztlich gesehen. Innerhalb eines Jahres wurden von den in die Studie eingeschlossenen Patientinnen und Patienten insgesamt fünf Studienvisiten dokumentiert. Die erste Studienvisite entspricht dem Stadium vor Beginn der Dupilumab-Therapie. Die folgenden vier Studienvisiten erfolgten jeweils im Abstand von 12 Wochen. So wurden insgesamt Daten von den Zeitpunkten 0, 12, 24, 36 und 48 Wochen nach Therapiebeginn bei allen eingeschlossenen Patienten erhoben. Bei jeder Studienvisite wurde eine *Blutprobe* entnommen (venöses Blut, Serum-Röhrchen mit 4,7 ml und EDTA-Röhrchen mit 2,7 ml). Zudem erfolgte jeweils eine *Abstrichentnahme* der Nasenschleimhaut, das Ausfüllen eines SNOT-20-Fragebogens, ein Riechtest und die endoskopische Beurteilung der Polypengröße. Alle in die Studie eingeschlossenen Patientinnen und Patienten hatten nach ausführlicher, medizinischer Beratung und Aufklärung durch einen HNO-Facharzt der Klinik schriftlich eingewilligt an der Studie teilzunehmen (s. Anhang Studienaufklärung und Datenschutzerklärung). Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes bewilligt (Kennziffer 166/20).

In der folgenden Abbildung ist das Studienschema (study flow chart) dargestellt:

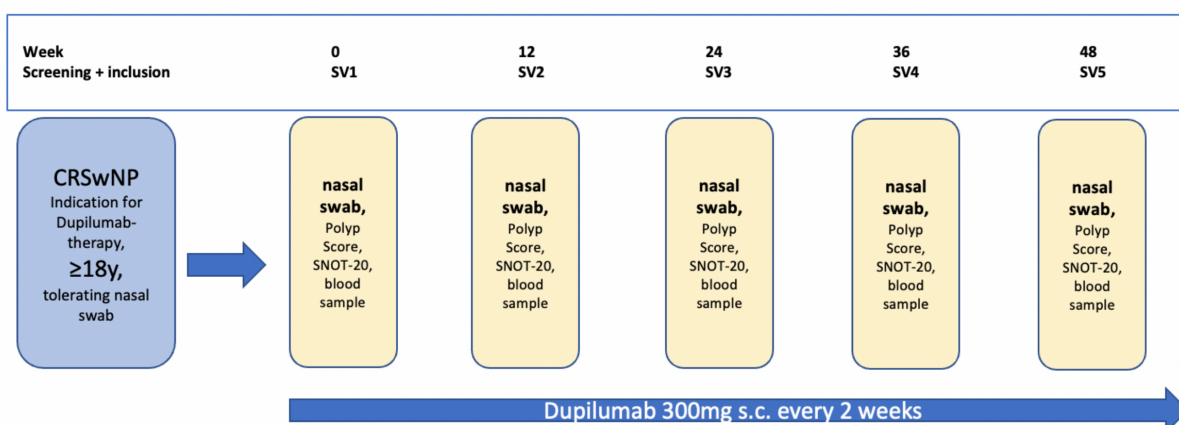


Abbildung 21 Studienprotokoll; SV, Studienvisite; s.c., subkutan; y, years.

### 3.3 Patientenrekrutierung und Begutachtung

Der Rekrutierungszeitraum erstreckte sich von Juni 2020 bis Oktober 2021. Durch das Monitoring der Patienten von einem Jahr erstreckte sich das Patienten-Follow-up bis einschließlich Oktober 2022. Als Einschlusskriterien wurden ein Alter von mindestens 18 Jahren, das Vorliegen einer CRSwNP mit Indikation für eine Dupilumab-Therapie entsprechend der Zulassung des Medikaments, ein Tolerieren der ambulanten nasalen Abstrichentnahme und eine Einwilligung in die Teilnahme der Studie definiert. Ausschlusskriterien umfassten eine fehlende Einwilligung zur Teilnahme an der Studie, eine nicht durchführbare Abstrichentnahme, ein Alter <18 Jahre, eine fehlende Geschäftsfähigkeit, das Vorliegen einer Schwangerschaft sowie eine fehlende Indikation zu einer Dupilumab-Therapie entsprechend der Zulassung des Medikaments. Alle Untersuchungen der Studienpatienten sowie die Abstrichentnahmen wurden von HNO-Fachärzten der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt.

Um ein signifikantes Ergebnis zu erreichen, wurde zu Beginn eine Poweranalyse durchgeführt. Zu vergleichen waren jeweils zwei Gruppen: low-responder/Eosinophil-low und good-responder/Eosinophil-high. Die Nullhypothese geht davon aus, dass kein signifikanter Unterschied festzustellen ist. Im Gegensatz dazu besagt die Alternativhypothese, dass die Eosinophil-high Gruppe mit mindestens 25% mehr Respondern als die Eosinophil-low Gruppe (75% versus 50%) besser anspricht. Folgende Rechnung wurde daraufhin mit dem „Power and Sample Size Calculator“ der Firma HyLown Consulting LLC durchgeführt:

**Formel 1 Poweranalyse, Erläuterungen siehe Text**

$$H_0 : p_A - p_B \leq \delta$$

$$H_1 : p_A - p_B > \delta$$

$$n_A = \kappa n_B \text{ and } n_B = \left( \frac{p_A(1-p_A)}{\kappa} + p_B(1-p_B) \right) \left( \frac{z_{1-\alpha} + z_{1-\beta}}{p_A - p_B - \delta} \right)^2$$

$$1 - \beta = \Phi(z - z_{1-\alpha/2}) + \Phi(-z - z_{1-\alpha/2}) \quad , \quad z = \frac{p_A - p_B - \delta}{\sqrt{\frac{p_A(1-p_A)}{n_A} + \frac{p_B(1-p_B)}{n_B}}}$$

Legende:

Group A = Eosinophil-high; Group A proportion =  $p_A$

Group B = Eosinophil-low; Group B proportion =  $P_B$

Superiority Margin =  $\delta = +/- 0,25$

Sampling Ratio  $\kappa = n_A/n_B = 1$

$\alpha = 0,05$ ; Power =  $1-\beta = 0,8$

$\Theta$  = normal distribution function

**Formel 2 Berechnung der Fallzahl**

$$\begin{aligned} n_1 = n_2 &= \left( \frac{z_{1-\alpha} + z_{1-\beta}}{p_A - p_B - \delta} \right)^2 \left( \frac{p_A(1 - p_A)}{\kappa} + p_B(1 - p_B) \right) \\ &= \left( \frac{z_\alpha + z_\beta}{p_A - p_B - \delta} \right)^2 \left( \frac{p_A(1 - p_A)}{\kappa} + p_B(1 - p_B) \right) \\ &= \left( \frac{1,645 + 0,842}{0,750 - 0,500 + 0,250} \right)^2 \left( \frac{0,750(1 - 0,750)}{1} + 0,500(1 - 0,500) \right) \\ &\approx 11 \end{aligned}$$

Nach dem Einsetzen der verschiedenen Parameter in die entsprechende Formel, stellte sich heraus, dass eine Gruppengröße von mind.  $n=11$  für die Eosinophil-high und -low Gruppe notwendig ist.

### 3.4 Abstrichzytologie

Zur Gewinnung von zytologischem Material wurden mithilfe des Medscand Cytobrush (Cooper Surgical) im Rahmen einer ambulanten Untersuchung der Patienten Abstrichpräparate angefertigt. Hierzu wurde der Kopf und der mittlere Anteil der unteren Nasenmuschel mit der Abstrichbürste mehrfach und in verschiedenen Richtungen abgestrichen. Anschließend wurde die Bürste gleichmäßig über einen Objektträger abgerollt, um die Zellen auf diesem gleichmäßig aufzubringen, und dann verworfen. Der Objektträger wurde daraufhin luftgetrocknet und anschließend lichtgeschützt und bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung verwahrt.

Zuvor wurde auch das Verfahren der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie ausprobiert. Dieses Verfahren ergab aber Abstriche, bei denen viele Zellen verloren gingen und daher nicht mehr repräsentative Ergebnisse zeigten. Aus diesem Grund sind wir bei der konventionellen Methode geblieben.



### 3.4.1 Färbung zytologischer Präparate nach einer modifizierten May-Grünwald-Giemsa Methode

#### Angesetzte Lösungen:

<b>Giemsa-Lösung</b>	25 ml Giemsa + 225 ml Phosphatpuffer + 400 µl 10 % Essigsäure
<b>Phosphatpuffer pH 7,2</b>	1,63 g Kaliumhydrogenphosphat + 3,2 g Di-Natriumhydrogenphosphat + Aqua dest ad 1000 ml (Herstellung der Apotheke des UKS)

Eine Färbung zytologischer Präparate nach May-Grünwald-Giemsa (MGG)<sup>5</sup> dient der Darstellung der Zellmorphologie und ermöglicht somit eine mikroskopische Beurteilung des jeweiligen Abstrichmaterials. Es handelt sich um einen zweistufigen Färbeprozess, der in jedem Labor einfach anzuwenden ist. Im ersten Schritt wurden die luftgetrockneten Präparate in einer Färbeküvette für drei Minuten in die unverdünnte May-Grünwald Farblösung, die aus eosinsaurem Methylenblau besteht, eingestellt. Die May-Grünwald Färbelösung wurde alle zwei Wochen erneuert und zwischen den Färbeprozessen kühl gelagert und verschlossen, da der Methylalkohol seine fixierende Wirkung durch Verdunsten an der Luft rasch verlieren kann. Anschließend wurden die Präparate entnommen und abtropfen gelassen. Es folgte die Inkubation der Präparate für 20 Minuten in der vorher gefilterten und modifizierten Giemsa-Lösung, die alle zwei Tage frisch angesetzt werden musste. Im letzten Schritt wurden die Präparate für etwa sieben Minuten fließend gewässert. Die Präparate wurden stehend auf einem Filterpapier getrocknet und anschließend mit dem Eindeckmedium Entellan eingedeckt. Die ausgehärteten Präparate wurden dann lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und konnten danach mikroskopisch beurteilt werden.

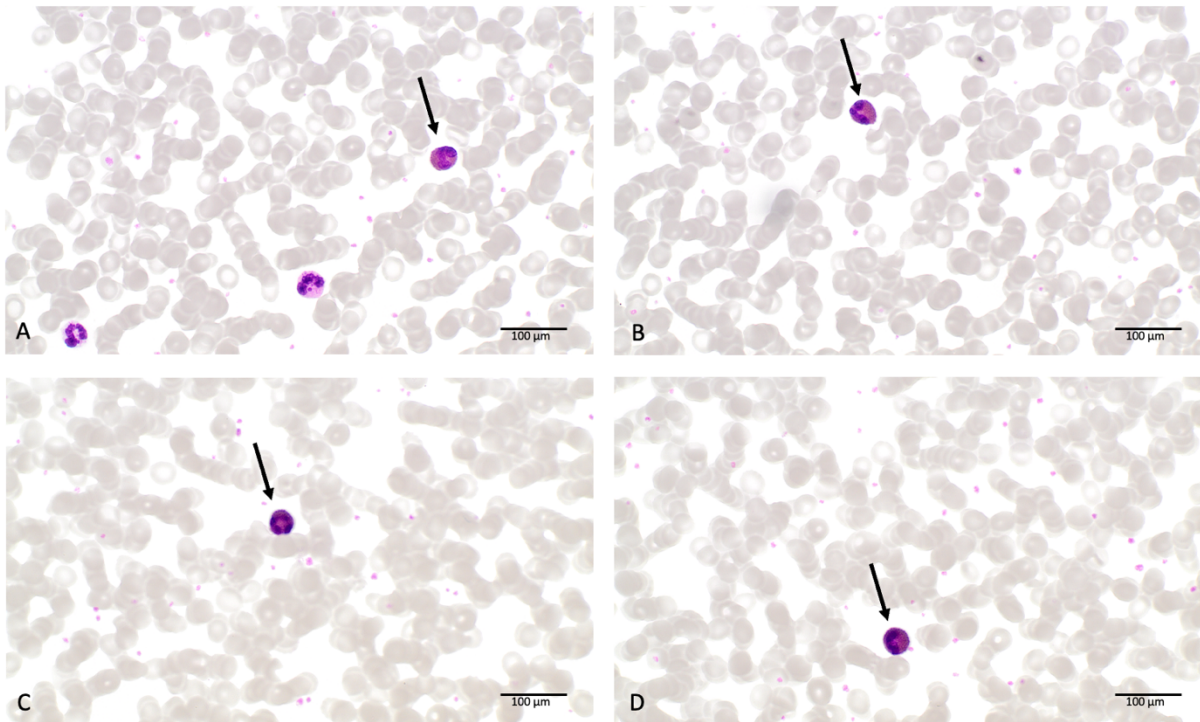
### 3.4.2 Etablierung der MGG-Färbung

Damit die eosinophilen Granulozyten noch besser zu identifizieren waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Etablierung der Färbung an Blutaussstrichen von Nicht-Studienpatienten durchgeführt und jeweils verschiedene Mengen an Essigsäure der Giemsa-Lösung hinzugefügt.

---

<sup>5</sup> Auch *Pappenheim-Färbung* genannt

Es wurden hierbei jeweils Färbungen mit 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 300  $\mu$ l und 400  $\mu$ l Essigsäurezusatz verglichen. Es zeigte sich, dass durch die Färbung mit 400  $\mu$ l Essigsäure die besten Ergebnisse erzielt werden können (s. Abbildung 22).

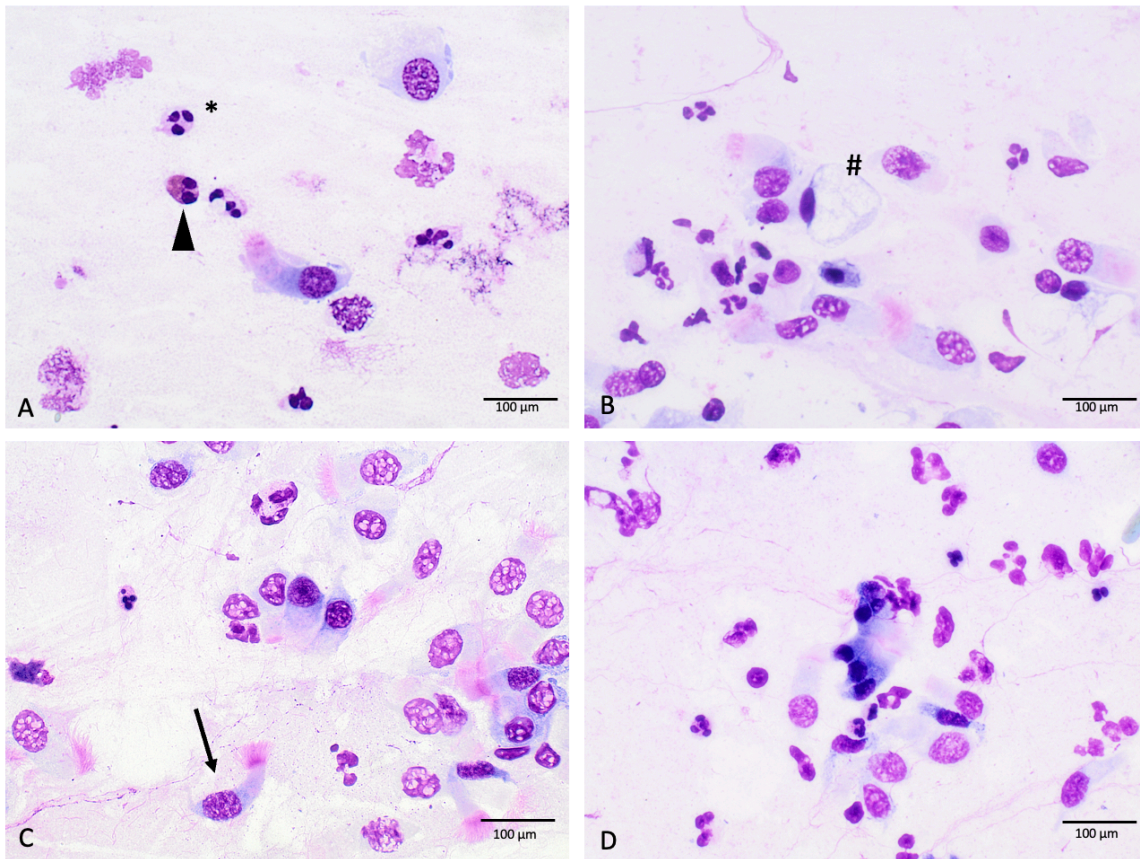


**Abbildung 22 MGG-Etablierung an Blutausstrichen**, A: Zusatz von 100  $\mu$ l Essigsäure, B: Zusatz von 200  $\mu$ l Essigsäure, C: Zusatz von 300  $\mu$ l Essigsäure, D: Zusatz von 400  $\mu$ l Essigsäure; Pfeil zeigt auf eosinophile Granulozyten, 60-fache Vergrößerung.

### 3.4.3 Zytomorphologische Auswertung und Beurteilung der Zelldifferenzierung

Bisher existiert kein einheitlicher methodischer Standard in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde zur zytologischen Beurteilung von Nasenabstrichen. Folglich wurde gemeinsam mit dem Betreuer dieser Doktorarbeit, Herrn Prof. Dr. Maximilian Linxweiler, und einer langjährig in der Zytodiagnostik erfahrenen MTA des Zytologielabors der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes, Frau Barbara Linxweiler, ein Schema erarbeitet, nach dem die nasalen Abstrichpräparate im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet wurden. Wichtigste Orientierungspunkte waren die Größe und Farbe der Zellen sowie die Chromatindichte und -struktur der Kerne. Jede Zelllinie zeigt hierbei ihre spezifischen Erkennungsmerkmale (s. Abbildung 23). So sind die Flimmerzellen gut an ihren charakteristischen Flimmerhaaren sowie ihrem eher länglichen, polygonalen Zytoplasma zu erkennen. Becherzellen haben stets eine kleine Vakuole und stellen sich kelchartig dar, wobei der Nukleus basal gelegen ist. Die Kerne der Leukozyten sind rotviolett, wobei die Granula der neutrophilen Granulozyten hellviolett und die Granula der eosinophilen Granulozyten rot bis

braunrot sind. Außerdem kann man bei den neutrophilen Granulozyten den segmentartigen Kern gut erkennen, während er bei den eosinophilen Granulozyten meist durch die Granula verdeckt wird. Die Lymphozyten sind im Vergleich zu den anderen Zellen kleiner und zusätzlich an ihrer eher bläulichen Farbe zu erkennen. Die genaue Auswertemethode der MGG-Präparate ist in Kapitel 3.10.1.1 näher beschrieben.



**Abbildung 23 MGG-gefärbte Beispiel-Bilder, Dreieck: Eosinophile Granulozyten, #: Becherzelle, \*: Neutrophiler Granulozyt, Pfeil: Flimmerzelle, 60-fache Vergrößerung.**

### 3.5 Untersuchungen an Patientenblut

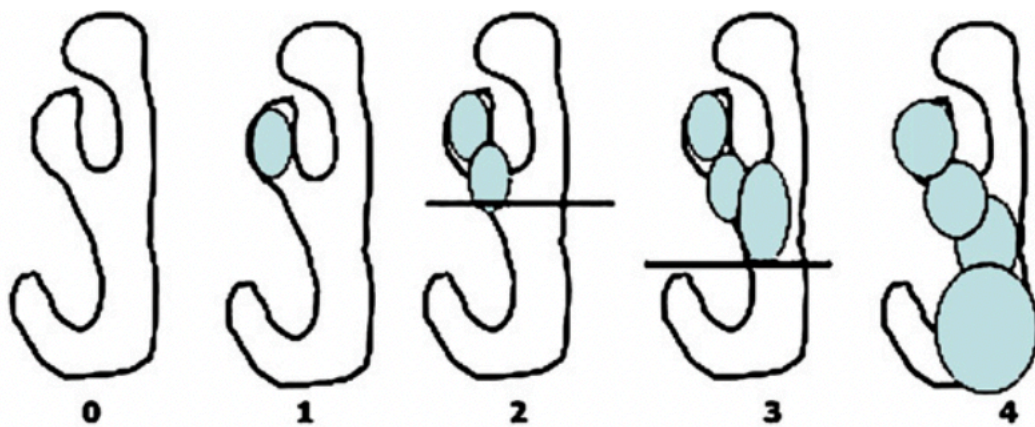
Von allen in die Studie eingeschlossenen Patienten wurde bei jeder Studienvisite eine Blutprobe venöses Blut entnommen. Es handelte sich dabei um ein Serum-Röhrchen (4,7 ml) zur Bestimmung des Gesamt-Serum-IgEs und ein EDTA-Röhrchen (2,7 ml) zur Erstellung eines Differentialblutbilds. Die Proben wurden durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes am gleichen Tag analysiert. Besonderer Augenmerk im Rahmen dieser Arbeit lag hierbei auf der Serum-IgE-Konzentration und dem prozentualen Eosinophilen-Anteil im Differentialblutbild.

### 3.6 Polypenscore

Zu jeder Studienvisite wurde der Polypenscore von einem Facharzt für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde nach dem folgenden Schema erhoben:

**Tabelle 4 Endoskopische Gradeinstellung Polyposis nasi (MELTZER et al., 2006)**

Endoskopisches Bild	Gradeinstellung
Keine Polypen sichtbar	0
Kleine Polypen im Bereich des mittleren Nasengangs	1
Multiple Polypen verlegen den mittleren Nasengang	2
Polypenwachstum überschreitet den mittleren Nasengang	3
Polypen verlegen die Nasenhaupthöhle	4



**Abbildung 24 Endoskopische Gradeinstellung Polyposis nasi (MELTZER et al., 2006).**

Abbildung 24 veranschaulicht den Polypenscore schematisch und Abbildung 1 in Abschnitt 2.1 zeigt endoskopische Beispielaufnahmen.

### 3.7 SNOT-20 Fragebogen

Im Rahmen jeder Studienvisite wurde von den Patienten der Sino-Nasal Outcome Test-20 (SNOT-20) ausgefüllt, welcher der Symptomerfassung dient (s. Abbildung 25). Im Anschluss wurden die einzelnen Werte addiert und die Endwerte im Verlauf verglichen. Je höher der Wert

ist, desto gravierender ist die Lebenseinschränkung und eine Abnahme der Werte ist somit positiv zu werten.

Um beurteilen zu können, wie stark die einzelnen Symptome ausgeprägt sind, kreuzen Sie bitte bei jeder einzelnen Frage die entsprechende Ziffer an.		Kein Problem	Sehr geringes Problem	Kleines Problem	Mittelgradiges Problem	Hochgradiges Problem	Schlechter kann es nicht mehr werden
Einzelfragen							
1	Nasenatmungsbehinderung	0	1	2	3	4	5
2	Niesreiz	0	1	2	3	4	5
3	Ständiges Naselaufen	0	1	2	3	4	5
4	Sekretfluss in den Rachen	0	1	2	3	4	5
5	Dickes, schleimiges Nasensekret	0	1	2	3	4	5
6	Räusperzwang, trockener Hals	0	1	2	3	4	5
7	Husten	0	1	2	3	4	5
8	Druckgefühl auf den Ohren	0	1	2	3	4	5
9	Ohrenschmerz	0	1	2	3	4	5
10	Riechminderung	0	1	2	3	4	5
11	Schwindelgefühl	0	1	2	3	4	5
12	Gesichtsschmerz, Druckgefühl im Gesicht	0	1	2	3	4	5
13	Probleme beim Einschlafen	0	1	2	3	4	5
14	Nächtliches Aufwachen	0	1	2	3	4	5
15	Tagesmüdigkeit	0	1	2	3	4	5
16	Verminderte Leistungsfähigkeit	0	1	2	3	4	5
17	Konzentrationsschwäche	0	1	2	3	4	5
18	Frustrationen/ Rastlosigkeit/ Reizbarkeit	0	1	2	3	4	5
19	Traurigkeit	0	1	2	3	4	5
20	Nebenhöhlenbeschwerden sind mir peinlich	0	1	2	3	4	5

Abbildung 25 SNOT-20 Fragebogen, Sino-Nasal Outcome Test, modifiziert nach (BAUMANN, 2009).

### 3.8 Olfaktometrie

Zur weiteren Symptomerfassung wurde bei jeder Studienvisite ein Riechtest (subjektive Olfaktometrie) durchgeführt. Hierzu wurde der 12er-SNIFFIN-Stick Test verwendet. Dabei wurden dem Patienten abwechselnd jeweils an die rechte und linke Nasenöffnung Geruchsstifte vorgehalten. Der Patient hatte die Aufgabe einen jeweils vordefinierten Geruch (z.B. Orange, Lavendel, Leder, Fisch) aus insgesamt 4 Riechstiften zu erkennen. Dieses Verfahren wurde dann seitengetrent insgesamt 12 mal für 12 Geruchsstoffe wiederholt. Anschließend wurde ausgewertet, wie viele von insgesamt 12 Geruchsstoffen auf der linken und auf der rechten Seite richtig erkannt wurden.

### 3.9 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.9.1 Antikörper

Als Primärantikörper für die immunzytochemischen (ICC) Färbungen der nasalen Abstrichpräparate wurde der Antikörper Anti-Ribonuclease 3/ECP antibody [EPR20357] der Firma abcam genutzt. Alle nasalen Abstrichpräparate wurden sowohl nach der MGG-Methode gefärbt (Grundlage für eine zytomorphologische differentialzytologische Auswertung) als auch immunzytochemisch mit dem genannten Antikörper gefärbt, um so eine noch spezifischere Identifikation der eosinophilen Granulozyten zu erlauben.

#### 3.9.2 Immunzytochemie

##### **Angesetzte Lösungen:**

<b>PBS (pH 7,4):</b>	10 PBS-Tabletten ad 2000 ml Aqua dest.
<b>Blockierlösung: 3%-ige BSA in PBS</b>	3 g Bovines Serum Albumin Granulat ad 100 ml PBS Waschpuffer
<b>Antikörperlösung: 1%-ige BSA in PBS</b>	1,7 ml BSA-PBS + 3,3 ml PBS
<b>Demaskierungslösung pH 6,0</b>	25 ml Retrieval Puffer 10 x konzentriert + 225 ml Aqua dest.
<b>Alkoholreihe</b>	alle Konzentrate wurden aus 99%-igem Ethanolkonzentrat hergetsellt
<b>70% Ethanol</b>	700 ml Ethanol ad 990 ml Aqua dest.
<b>80 % Ethanol</b>	800 ml Ethanol ad 990 ml Aqua dest.

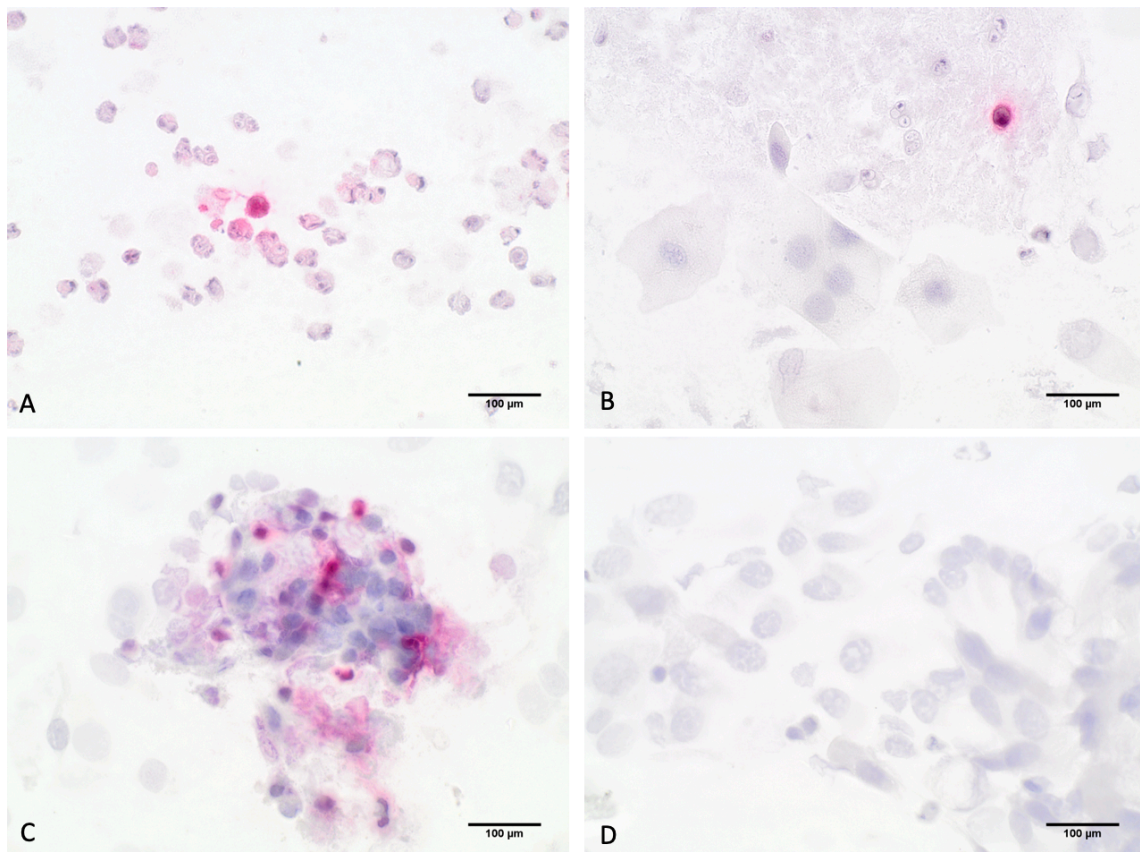
<b>95 % Ethanol</b>	950 ml Ethanol ad 990 ml Aqua dest.
<b>Chromogenlösung</b>	750 µl Chromogensubstratlösung + 30 µl Chromogen Red 1 + 30 µl Chromogen Red 2 + 30 µl Chromogen Red 3
<b>Hämatoxylin</b>	bei jedem Färbegang filtern

Um die MGG-gefärbten Präparate auch für eine immunzytochemische Färbung nutzen zu können, ohne dafür einen zweiten Abstrich vom Patienten entnehmen zu müssen, wurden die MGG-Präparate zunächst für mehrere, in der Regel fünf Tage, in Xylol eingelegt, damit sich die Deckgläser lösen können. Mittels einer absteigenden Alkoholreihe (99%, 95%, 80%, 70% Ethanol, jeweils vier Minuten) wurden die Präparate dann in ein wässriges Milieu überführt. Anschließend wurden die Präparate mehrmals in Aqua dest. und dann in PBS-Waschpuffer für jeweils zwei Minuten gespült. Als nächstes erfolgte eine Fixierung der Präparate für 15 Minuten in gepuffertem Formalin. Daraufhin wurden die Präparate dreimal in PBS-Waschpuffer für jeweils zwei Minuten gespült und in Aqua dest. eingestellt.

Als nächster Schritt erfolgte die Demaskierung der Epitope. Dazu wurde eine Küvette mit dem Retrieval-Puffer (Demaskierungslösung) in einem Dampfgerar bei 95°C für 20 Minuten eingestellt. Anschließend wurde die Küvette entnommen und die Präparate wurden mit offenem Deckel auf  $\leq 50$  °C abgekühlt.

Es folgte ein dreimaliges Spülen der Präparate für jeweils zwei Minuten in PBS-Waschpuffer. Unspezifische Bindungsstellen wurden im nächsten Schritt durch eine Inkubation mit 3 %-BSA-PBS-Puffer für 40 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer geblockt. Anschließend wurde der Puffer ablaufen gelassen und die beschichteten Präparate mit der Antikörperlösung, die den Primärantikörper beinhaltet, für 50 Minuten bei Raumtemperatur ebenfalls in der feuchten Kammer inkubiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle Präparate während des gesamten Prozesses komplett von Antikörperlösung bedeckt waren. Eine Negativ-Kontrolle wurde mit 1 %igem BSA-PBS-Puffer inkubiert. Anschließend erfolgte ein viermaliges Spülen aller Präparate für jeweils drei Minuten mit PBS-Waschpuffer, die Negativ-Kontrolle wurde in einer gesonderten Standküvette gespült. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit biotinyliertem Sekundärantikörper für 30 Minuten in der feuchten Kammer beschichtet, wozu das DakoReal-Kit 5005 verwendet wurde. Nach weiterem dreimaligem Spülen für jeweils zwei Minuten folgte die Inkubation mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase für weitere 30 Minuten. Nach erneutem dreimaligem Spülen in PBS wurden die Präparate für 15 Minuten mit

frisch angesetzter Substrat-Chromogenlösung beschichtet. Durch gründliches und mehrmaliges Spülen mit Aqua dest. wurden die Chromogenreste entfernt und dann mit nichtalkoholischer Hämatoxylinlösung für sechs Minuten gegengefärbt. Daraufhin wurden die Präparate für ebenfalls sechs Minuten fließend gewässert. In den letzten Schritten durchliefen die Präparate für jeweils zwei Minuten eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 95%, 99% Ethanol) und dreimalig für jeweils drei Minuten eine Xylol-Küvette. Eingedeckt wurde mit dem Eindeckmedium Entellan. Eine Lagerung der nach einigen Tagen ausgehärteten Präparate erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Jede Färbeserie umfasste zusätzlich geeignete Negativ- (Durchführung ohne Primärantikörper) und Positivkontrollen, wofür wir eigens hergestellte Präparate aus Granulozyten-Konzentraten nutzten (s. 3.9.4). Abbildung 26 zeigt einige beispielhafte Bilder der ICC-Färbung.



**Abbildung 26 ICC-gefärbte Beispiel-Bilder, A,B,C: Eosinophile Granulozyten, D: negativ Kontrolle; 60-fache Vergrößerung.**

In der folgenden Tabelle ist der Färbeprozess in den einzelnen Schritten übersichtlich dargestellt.



**Tabelle 5 ICC Färbung**

Zeitangabe	Durchgeführte Maßnahme
Ca. 5 Tage vor der Färbung	Einlegen in Xylol
Jeweils 4 min	Absteigende Alkoholreihe (99%, 95%, 80%, 70%)
3 x 30 sec	Aqua dest
2 x 2 min	Waschen in PBS-Puffer
15 min	Formalin-Fixation
3 x 2 min	Waschen in PBS-Puffer
20 min	Kochen im Retrievalpuffer
20 min	Abkühlen unter 50 °C
3 x 2 min	Waschen in PBS-Puffer
40 min	Blocken mit 3%- BSA-PBS- Puffer
50 min	Inkubation des Primärantikörpers
4 x 3 min	Waschen in PBS-Puffer
30 min	Inkubation mit Sekundärantikörper
3 x 2 min	Waschen in PBS-Puffer
30 min	Inkubation mit Streptavidin-alkalische Phosphatase
3 x 2 min	Waschen in PBS-Puffer
15 min	Inkubation mit Substrat-Chromogenlösung
5 x 30 sec	Aqua dest.
6 min	Färben in Hämatoxylin
6 min	Fließend wässern
Jeweils 2 min	Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 95%, 99%)

3 x 3 min	Xylol
	Eindecken mit Entellan

### 3.9.3 Etablierung der immunzytochemischen ECP-Färbung

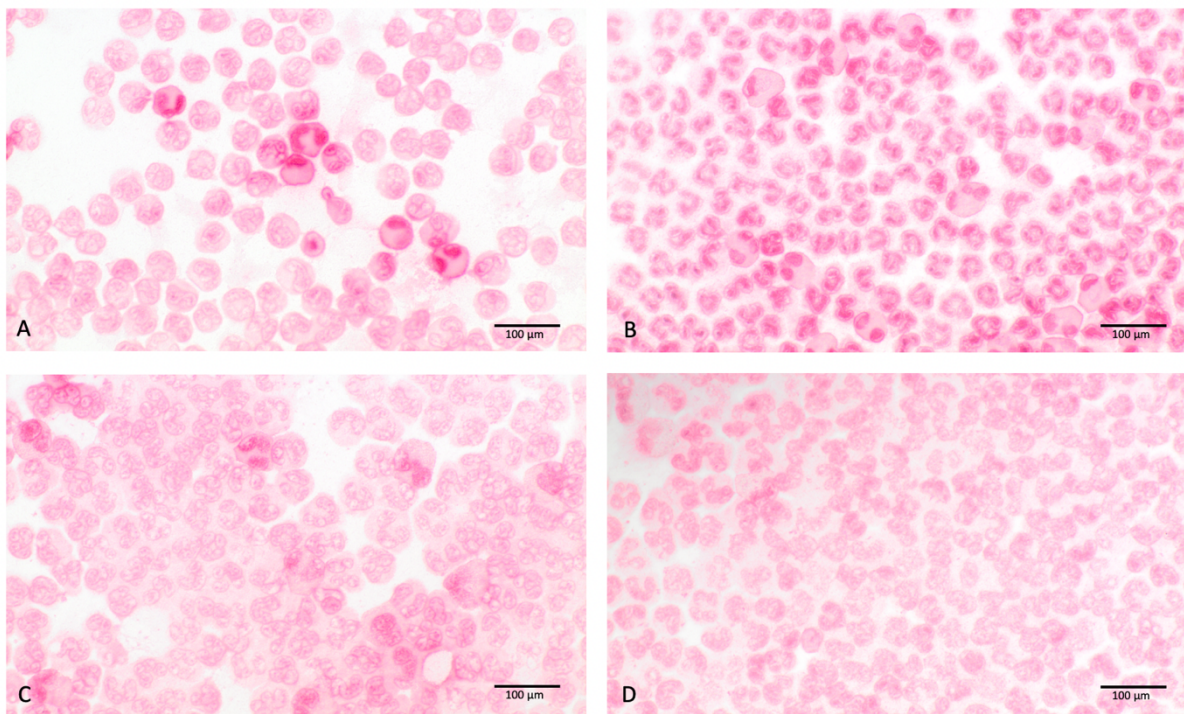
Bevor die Färbung an den Abstrich-Präparaten der Studienpatienten durchgeführt werden konnte, wurde eine Etablierung der immunzytochemischen Färbung an eigens hergestellten Präparaten von Granulozyten-Konzentraten durchgeführt (s. 3.9.4), um möglichst viele eosinophile Granulozyten darstellen und deren Färbereaktion beurteilen zu können. Als Grundlage diente ein Standardprotokoll des Zytologielabors der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, welches durch Modifizierung einzelner Teilschritte für die Bedürfnisse dieser Studie adaptiert wurde.

Folgende Färbebedingungen wurden im Rahmen des Etablierungsverfahrens getestet:

- pH 6, 25 min. Demaskierung, Fixierung mit Zamboni-Lösung (10 min.) und Formalin (15 min.)
- pH 6, 20 min. Demaskierung, Fixierung mit Zamboni-Lösung (10 min.) und Formalin (15 min.) (s. Abbildung 27, B)
- pH 9, 20 min. Demaskierung, Fixierung mit Zamboni-Lösung (10 min.) und Formalin (15 min.)
- pH 9, 15 min. Demaskierung, Fixierung mit Zamboni-Lösung (10 min.) und Formalin (15 min.) (s. Abbildung 27, E)
- pH 6, 25 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (15 min.)
- pH 6, 20 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (15 min.) (s. Abbildung 27, A)
- pH 9, 20 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (15 min.)
- pH 9, 15 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (15 min.) (s. Abbildung 27, C)
- pH 6, 25 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (10 min.)
- pH 6, 20 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (10 min.)
- pH 9, 20 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (10 min.)
- pH 9, 15 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (10 min.)

- pH 6, 25 min. Demaskierung, Fixierung mit Zamboni-Lösung (10 min.) und Formalin (15 min.), Blocking mit 6%-BSA-PBS-Puffer
- pH 9, 20 min. Demaskierung, Fixierung mit Zamboni-Lösung (10 min.) und Formalin (15 min.), Blocking mit 6%-BSA-PBS-Puffer

Abbildung 27 zeigt Bilder der ICC-Etablierung an Granulozyten-Konzentraten, wobei vier verschiedene Färbeverfahren dargestellt sind. Da die Methode, die in Abbildung 27 A abgebildet ist, am spezifischsten reagiert hat, haben wir uns letztendlich für dieses Verfahren entschieden.



**Abbildung 27 Bilder der ICC-Etablierung an Granulozyten Konzentraten;** A: pH 6, 20 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (15 min.); B: pH 6, 25 min. Demaskierung, Fixierung mit Zamboni-Lösung (10 min.) und Formalin (15 min.); C: pH 9, 15 min. Demaskierung, Fixierung mit Formalin (15 min.); D: pH 9, 15 min. Demaskierung, Fixierung mit Zamboni-Lösung (10 min.) und Formalin (15 min.)

### 3.9.4 Herstellung der Granulozyten-Konzentrate

Von einer unabhängigen Versuchsperson wurde 6 ml venöses Blut in einem EDTA-Röhrchen entnommen. Zur Herstellung des Gradienten wurde 3,0 ml GranuloSep™ GSM 1119 aseptisch in ein 15 ml sauberes konisches Zentrifugenröhrchen überführt und dieses vorsichtig mit 3,0 ml HiSep™ LSM 1077 Lösung überschichtet. Anschließend wurde der obere Gradient des Röhrchens mit 6,0 ml Vollblut überschichtet. Dabei musste besonders darauf geachtet werden, dass beim Überführen der jeweiligen Phasen das Röhrchen schräg gehalten wird und diese langsam eingelaufen lassen wurden, damit es nicht zu einer Vermischung der jeweiligen Phasen

kommt. Um eine aseptische Arbeit zu gewährleisten, sollte man die genannten Schritte am besten in einer Sterilbank vornehmen und diese vorher desinfizieren. Ohne die verschiedenen Phasen miteinander zu vermischen, wurde das Röhrchen nun in die Zentrifuge gestellt. Das Röhrchen wurde dann bei 700 x g für 30 Minuten bei Raumtemperatur (15–25 °C) zentrifugiert. Ein Zentrifugieren bei niedrigeren Temperaturen als 4 °C kann zu Zellverklumpung oder schlechter Erholung führen und sollte deshalb verhindert werden. Die Bremse der Zentrifuge sollte bei diesem Schritt immer ausgeschaltet sein und die Zentrifugation sollte Erythrozyten sedimentieren. Zellen der granulozytären Reihe finden sich an der 1077/1119-Interphase, während Lymphozyten, mononukleare Zellen und Blutplättchen an der Plasma/1077-Interphase gefunden werden (s. Abbildung 28). Nach der Zentrifugation wurde das Zentrifugenröhrchen vorsichtig entfernt und es konnten zwei unterschiedliche durchsichtige Schichten beobachtet werden (Schichten A und B). Schicht A (mononukleäre Zellen) wurde für den weiteren Versuchsablauf nicht weiter benötigt und nach Aspiration verworfen, so dass Schicht B als Rest verblieb (Granulozyten). Die Zellen aus Schicht B wurden dann in ein separates Röhrchen überführt. In das Röhrchen wurden 10 ml isotonische phosphatgepufferte Kochsalzlösung hinzugefügt, um die Zellen zu waschen. Anschließend erfolgte ein weiteres Zentrifugieren für 10 Minuten bei 200 x g. Der entstehenden Überstand wurde entfernt. Die Zellen wurden anschließend durch vorsichtiges Ansaugen mit einer Pipette resuspendiert und der bereits beschriebene Waschvorgang zwei weitere Male wiederholt. Nach insgesamt drei Waschvorgängen wurde der entstandene Überstand verworfen und es wurde dem Granulozyten-Konzentrat erneut 2,5 ml isotonische phosphatgepufferte Kochsalzlösung zugefügt, um die Zellen zu resuspendieren. Im letzten Schritt wurden einzelne Präparate hergestellt, indem Objektträger in die Cytospin Zentrifuge eingestellt und für 5 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 1 800 RFM mit der Suspension bedeckt wurden. Jedes Präparat enthält dabei 200 µl der Suspension. Bis zur weiteren Nutzung wurden die Präparate eingefroren.

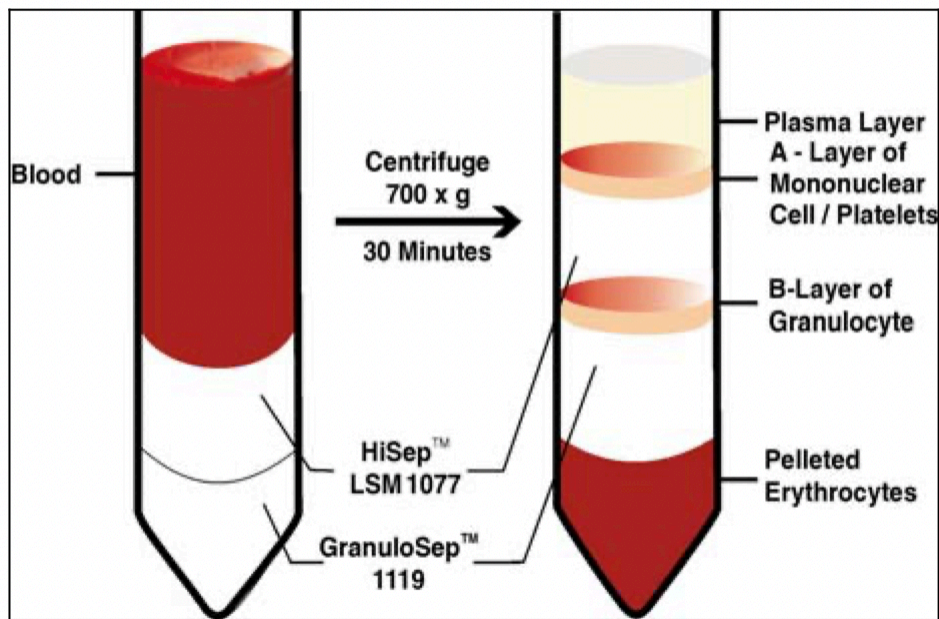


Abbildung 28 Herstellung der Granulozyten Konzentrate, modifiziert nach (HIMEDIA).

### 3.10 Analytische Methoden

#### 3.10.1 Semiquantitative Auswertung der zytologischen Präparate

Sowohl die MGG-Färbung als auch die ICC-Färbung der nasalen Abstrichpräparate wurden mit dem Olympus BX61 Mikroskop und der Software CellSens Standard ausgewertet. Der Auswerteprozess ist im Folgenden einzeln für die beiden Färbungen beschrieben.

##### 3.10.1.1 MGG- Präparate

Wie unter 3.4.3 beschrieben, wurden die einzelnen Zelltypen anhand ihrer charakteristischen zytomorphologischen Merkmale identifiziert. Zur Auswertung wurden in jedem nasalen Abstrichpräparat 20 Gesichtsfelder in 60-facher Vergrößerung ausgezählt, wobei die Gesamtzellzahl sowie die prozentualen Anteile der Flimmerzellen, Becherzellen, eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten ausgewertet wurden. Tabelle 6 zeigt ein Muster des für diese Auswertung verwendeten Schemas. Jedes Präparat wurde in einem gleichen Schema ausgewertet und von einer unabhängigen Zytologin mit mehrjähriger Erfahrung verblindet begutachtet.

**Tabelle 6 Mustertabelle der MGG-Auswertung;** FZ, Flimmerzellen; BZ, Becherzellen; Eo, eosinophile Granulozyten, N= neutrophile Granulozyten, L, Lymphozyten; SV, Studiervisite.

<i>Patientennummer</i>	SV1					
Blickfeld	FZ	BZ	Eo	N	L	Gesamt
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
<b>Gesamt</b>						

### 3.10.1.2 Immunzytochemisch gefärbte Präparate

In der immunzytochemischen Färbung wurden ebenfalls pro nasalem Abstrichpräparat 20 Gesichtsfelder bei 60-facher Vergrößerung analysiert. Allerdings wurden bei der ICC-Färbung nur die Zellen ausgezählt, die eine spezifische Färbereaktion zeigten und somit spezifisch als eosinophile Granulozyten identifiziert werden konnten. Hierbei wurde nicht der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten, sondern die Gesamtzahl dieser Zellen für die weitere Analyse genutzt. Tabelle 7 zeigt ein Muster des für diese Auswertung verwendeten Schemas. Jedes Präparat wurde in einem gleichen Schema ausgewertet und von einer unabhängigen Zytologin mit mehrjähriger Erfahrung verblindet begutachtet.

**Tabelle 7** Mustertabelle der ICC- Auswertung; SV, Studiervisite.

Patientennummer	SV1	SV2	SV3	SV4	SV5
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
<b>Gesamt</b>					

### 3.10.2 Statistische Analyse

Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software Prism des Herstellers GraphPad in der Version 8.4.3 durchgeführt. In unserer Längsschnittstudie handelte es sich um abhängige Stichproben, da der Verlauf einzelner Parameter über ein Jahr untersucht wurde. Zunächst wurden die jeweils betrachteten Parameter mit dem Shapiro-Wilk Test und dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung überprüft. Bei einer Normalverteilung wurde der One-way ANOVA und bei keiner Normalverteilung der Friedman Test benutzt, um den Unterschied zu analysieren und somit die Signifikanz zu testen. Als Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) wurde ein Wert von 0,05 festgelegt, womit p-Werte kleiner als 0,05 als signifikante Ergebnisse angesehen wurden.

In den Grafiken werden Symbole genutzt, um die Signifikanz zu veranschaulichen. Die Definition der Symbole ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 8 Definition der Signifikanz-Symbole**

P-Wert	Bedeutung	Symbol
<0,0001	Hochsignifikant	****
0,0001 bis 0,001	Hochsignifikant	***
0,001 bis 0,01	Sehr signifikant	**
0,01 bis 0,05	Signifikant	*
≥0,05	Nicht signifikant	Ns

Um eine Korrelation zu untersuchen wurden die Parameter ebenfalls zunächst auf Normalverteilung getestet. Bei einer Normalverteilung wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt und bei keiner Normalverteilung der Spearman Korrelationskoeffizient. Anschließend wurde jeweils die lineare Regression angewendet.

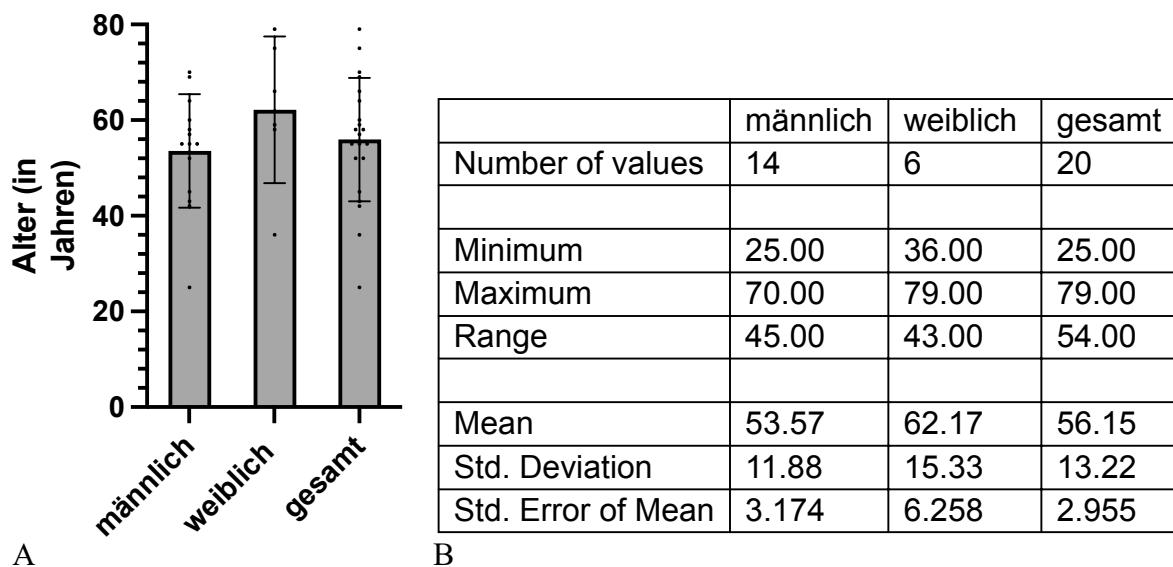
Um zwei Gruppen auf einen signifikanten Unterschied zu testen (good-responder vs. low-responder) wurde in Abhängigkeit von der Normalverteilung der t-Test (Normalverteilung) oder der Mann-Whitney-U-Test (keine Normalverteilung) angewendet.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

In der Studie wurden 25 Patientinnen und Patienten aufgenommen, von denen fünf im Verlauf ausgeschlossen werden mussten, da bei fehlendem Ansprechen (n=2) bzw. schlechter Verträglichkeit (n=1) die Dupilumab-Therapie frühzeitig abgebrochen werden musste. Zwei weitere Patienten bekamen weiterhin die Dupilumab-Therapie, wurden allerdings ausgeschlossen, da sie den ersten Studienbesuch verpasst hatten. Unter den 20 verbliebenen Patienten handelte es sich um 14 männliche und 6 weibliche Patienten. Das Durchschnittsalter der Frauen betrug 62 Jahre, das der Männer 54 Jahre, sodass sich ein Gesamtdurchschnitt von 56 Jahren zeigte (s. Abbildung 29)



**Abbildung 29** Statistische Auswertung der Geschlechterverteilung und des Durchschnittsalters. A: Punkte entsprechen den einzelnen Werten, Antenne markiert das obere (97,5 %) und untere (2,5 %) Quartil, die Säule zeigt den Median an, Punkte außerhalb des Interquartiles sind Ausreißer; B: Tabelle, deskriptive Statistik der männlichen und weiblichen Patienten.

Alle 20 Patienten hatten die Diagnose einer chronischen Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (CRSwNP). 14 von 20 Patienten (70 % der Patienten) hatten in den Jahren vor der Dupilumab-Therapie bereits eine systemische Kortisontherapie erfahren, bei keinem der Patienten war nach Einleitung der Dupilumab-Therapie eine erneute systemische Kortisontherapie erforderlich. Bei 18 von 20 Patienten war ein Asthma bronchiale bekannt (90 % der Patienten) und 9 von 20

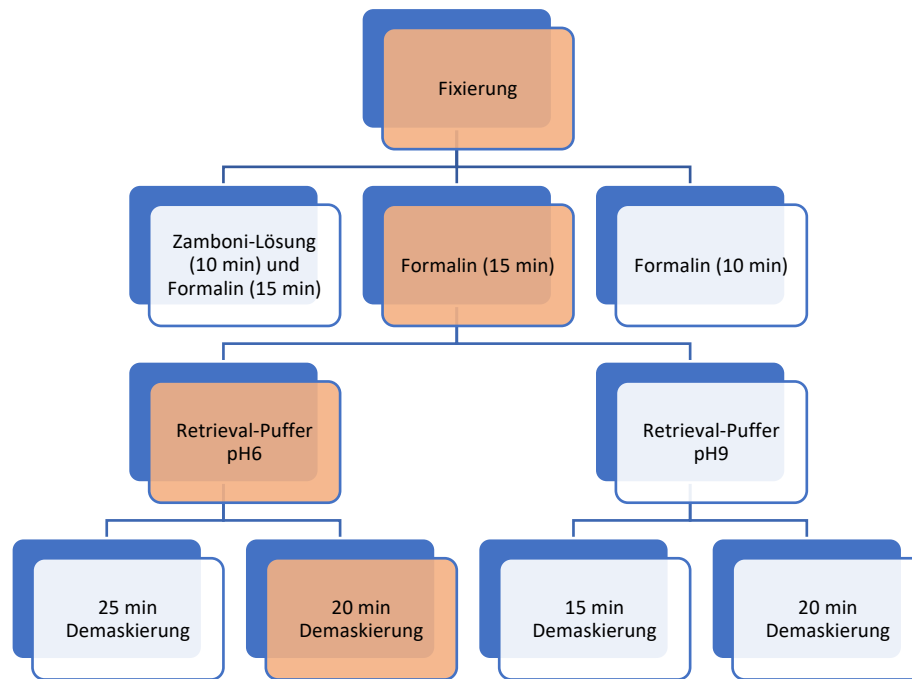
Patienten (45 % der Patienten) litten zusätzlich unter einer Allergie. Bei 4 von 20 Patienten (20 % der Patienten) wurde zudem eine Samter-Trias festgestellt. Ein Patient (5 % der Patienten) hatte außerdem die Nebendiagnose einer eosinophilen Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA). 14 von 20 Patienten (70 % der Patienten) hatten in der Vergangenheit mindestens eine Nasennebenhöhlen-Operation (s. Abbildung 30). Alle Patienten gaben an, dass sie seit Therapiebeginn ihre jeweilige Medikation (Bedarf an cortisonhaltigem Nasenspray; Ashma Bedarfsmedikation, Antihistaminikum bei Allergie) reduziert haben.



**Abbildung 30 Klinische Charakteristika des Patientenkollektivs;** CS, Corticosteroide; EGPA, Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis; FESS, Functional Endoscopic Sinus Surgery. Nähere Erläuterungen siehe Text.

## 4.2 Ergebnisse der immunzytochemischen Etablierung

Um die eosinophilen Granulozyten in der immunzytochemischen Färbung identifizieren zu können, wurde an eigens hergestellten Granulozytenkonzentraten eine Etablierung durchgeführt. Als Grundlage diente ein Standardprotokoll des Zytologielabors der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, welches durch Modifizierung einzelner Teilschritte für die Bedürfnisse dieser Studie adaptiert wurde. Dabei wurde die Fixierung, der pH-Wert des Retrieval-Puffers und die Demaskierungszeit variiert (s. Abbildung 31).



**Abbildung 31 Etablierung der geeigneten Fixierung und Demaskierung**, Orangener Pfad wurde letztendlich zur Färbung gewählt. Nähere Erläuterungen siehe Text.

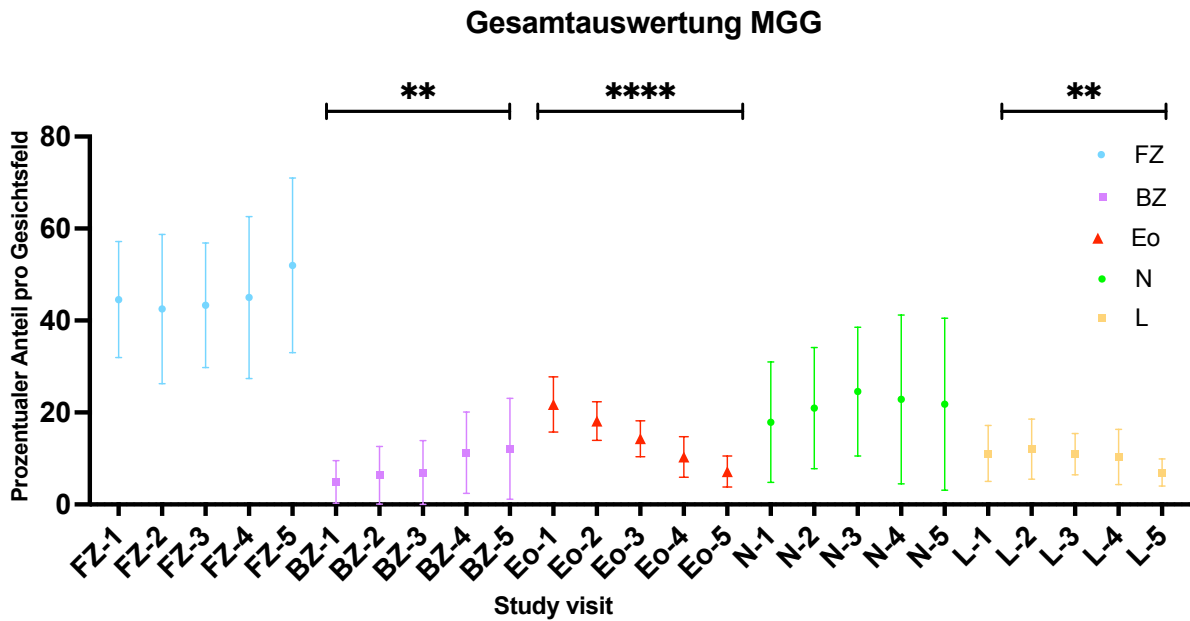
Nach der Auswertung der verschiedenen Etablierungsversuche stellte sich heraus, dass der pH 6 Puffer am Besten geeignet ist, da die Präparate darunter die schönsten Färbeergebnisse zeigten (s. Abbildung 27). Da auffiel, dass die Präparate, die mit Zamboni-Lösung fixiert wurden, eine veränderte Zellmorphologie mit zum Teil nicht mehr intakten Zellen zeigten, wurde beschlossen diesen Schritt wegzulassen und nur Formalin zur Fixierung zu nutzen. Außerdem zeigte sich, dass eine kürzere Demaskierungszeit weniger unspezifische Reaktionen aufwies, so dass eine Demaskierungszeit von 20 Minuten für das spätere Standardprotokoll gewählt wurde. Im letzten Schritt wurde die zu verwendende Antikörperkonzentration titriert, um eine zu schwache oder umgekehrt auch überschießende Färbereaktion zu vermeiden. Verglichen wurden die Färbungen mit einer Verdünnung von jeweils 1:6000 und 1:4000, wobei die Färbung mit einer Verdünnung von 1:4000 deutlich bessere Ergebnisse zeigte. Nach erfolgreicher Etablierung der Versuchsprotokolle wurde anschließend mit der Färbung der Patientenabstriche nach dem neu entwickelten Standardprotokoll begonnen.

### 4.3 Auswertung der einzelnen Parameter

Innerhalb eines individuellen Follow-up von jeweils einem Jahr pro Patient nach Beginn der Dupilumab-Therapie wurden in insgesamt fünf Studienvisiten verschiedene Parameter gemessen und der Verlauf dieser Parameter beobachtet. Nachfolgend werden diese Daten im zeitlichen Verlauf dargestellt und ausgewertet.

### 4.3.1 Zytomorphologische Auswertung der MGG-Präparate

In Abbildung 32 ist die Gesamtauswertung der MGG-Färbung für alle Patienten als Gesamtkollektiv zu sehen. Jede Farbe steht für eine Zellart und beinhaltet jeweils die fünf Studienvisiten. Innerhalb der Flimmerzellen konnte ein Anstieg im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Ein leichter Anstieg war auch innerhalb der Becherzellen zu erkennen. Die eosinophilen Granulozyten waren signifikant gesunken, während bei den neutrophilen Granulozyten keine bestimmte Tendenz im Verlauf der Studienvisiten beobachtet werden konnte. Der prozentuale Lymphozytenanteil zeigte ebenfalls eine sinkende Tendenz.

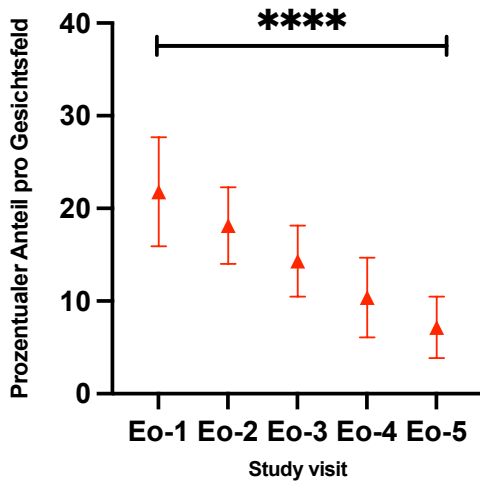


**Abbildung 32 Graphische Auswertung der einzelnen Zellreihen im Verlauf;** FZ, Flimmerzellen; BZ, Becherzellen; Eo, eosinophile Granulozyten; N, neutrophile Granulozyten, L: Lymphozyten. Der Whisker zeigt die Standardabweichung und die mittlere Markierung den Mittelwert an. Die p-Werte sind mit den Symbolen \*\* für p-Wert <0,01 und \*\*\*\* für p-Wert < 0,0001 gekennzeichnet. Erläuterung siehe Text.

Für die statistische Testung in Abbildung 32 wurde für die einzelnen Zellreihen je nach Normalverteilung entweder ein One-way ANOVA oder ein Friedman-Test verwendet.

Da die eosinophilen Granulozyten in einer von fünf Studienvisite nicht normalverteilt waren, wurde der Friedman-Test angewendet. Es ergab sich insgesamt ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p < 0,0001$ ) (s. Abbildung 33). Beim direkten Vergleich der Mittelwerte jeder einzelnen Studienvisite mithilfe des Dunn's multiple comparison Tests, zeigte sich, dass direkt aufeinanderfolgende Studienvisiten keinen signifikanten Unterschied zeigten, aber der Unterschied umso signifikanter wurde je weiter die einzelnen Studienvisiten voneinander entfernt waren (s. Tabelle 9).

## Eosinophile Granulozyten MGG



	Eo-1	Eo-2	Eo-3	Eo-4	Eo-5
Minimum	11.00	13.00	9.000	5.000	3.000
25% Percentile	18.25	15.00	11.25	7.250	5.000
Median	21.00	17.50	13.00	9.000	6.000
75% Percentile	25.00	20.50	17.00	12.75	8.000
Maximum	37.00	31.00	23.00	24.00	16.00
Mean	21.75	18.15	14.30	10.35	7.150
Std. Deviation	6.016	4.209	3.895	4.416	3.376
Std. Error of Mean	1.345	0.9411	0.8709	0.9875	0.7549
Lower 95% CI	18.93	16.18	12.48	8.283	5.570
Upper 95% CI	24.57	20.12	16.12	12.42	8.730
Mean ranks	4.700	3.975	2.975	2.075	1.275

A

B

**Abbildung 33 Auswertung der eosinophilen Granulozyten im Verlauf.** Graph A: Der Whisker zeigt die Standardabweichung und die mittlere Markierung den Mittelwert an. Der p-Wert ist mit den Symbolen \*\*\*\* für  $p < 0,0001$  gekennzeichnet. Bei dem statistischen Test handelt es sich um einen Friedman Test. Tabelle B: Deskriptive Statistik; Eo:eosinophile Granulozyten.

**Tabelle 9 Multiple Comparisons Test der einzelnen Studienvisiten,** bei dem statistischen Test handelt es sich um den Dunn's multiple Comparisons Test.

Dunn's multiple comparisons test	Rank sum diff.	Significant?	Summary
Eo-1 vs. Eo-2	14.50	No	ns
Eo-1 vs. Eo-3	34.50	Yes	**
Eo-1 vs. Eo-4	52.50	Yes	****
Eo-1 vs. Eo-5	68.50	Yes	****
Eo-2 vs. Eo-3	20.00	No	ns
Eo-2 vs. Eo-4	38.00	Yes	**
Eo-2 vs. Eo-5	54.00	Yes	****
Eo-3 vs. Eo-4	18.00	No	ns
Eo-3 vs. Eo-5	34.00	Yes	**
Eo-4 vs. Eo-5	16.00	No	ns

Die Flimmerzellen ergaben in allen statistischen Tests (D'Agostino & Pearson Test, Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test, Kolmogorov-Smirnov Test) eine Normalverteilung, sodass der One-way ANOVA Test angewendet wurde. Trotz einem tendenziellen Anstieg im Graphen, konnte kein signifikantes Ergebnis statistisch festgestellt werden. Um einen Multiplen Vergleich durchzuführen, wurde der Tukey's multiple comparisons test angewendet. Dieser ergab, dass sich auch die Mittelwerte der einzelnen Studienvisiten im direkten Vergleich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Da die Becherzellen keine Normalverteilung in den statistischen Tests (D'Agostino & Pearson Test, Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test, Kolmogorov-Smirnov Test) aufwiesen, wurde der Friedman-Test angewendet. Er ergab ein statistisch signifikantes Ergebnis ( $p < 0,01$ ), also eine signifikante Steigung im Verlauf. Im Vergleich der einzelnen Studienvisiten war eine Signifikanz vor allem zwischen dem ersten und vierten Studienbesuch zu beobachten.

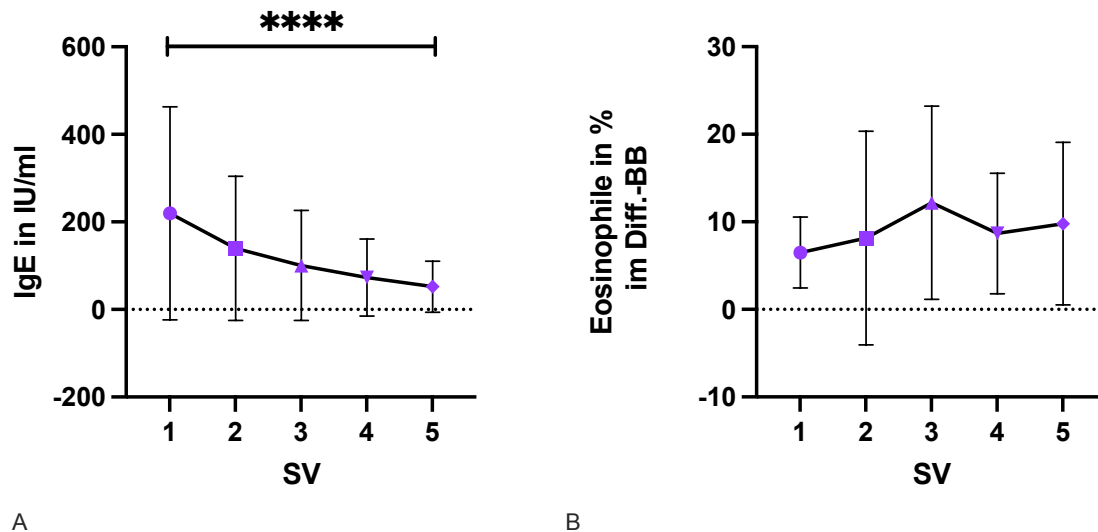
Die neutrophilen Granulozyten zeigten zwar im D'Agostino & Pearson Test eine Normalverteilung, diese spiegelte sich allerdings im Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test und Kolmogorov-Smirnov Test nicht wider, sodass der Friedman-Test angewendet wurde. Es konnte keine Signifikanz innerhalb der neutrophilen Granulozyten festgestellt werden.

Auch bezüglich der Lymphozyten wurde der Friedman Test aufgrund der fehlenden Normalverteilung (D'Agostino & Pearson Test, Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test, Kolmogorov-Smirnov Test) angewendet. Es zeigte sich ein signifikantes Ergebnis ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich der einzelnen Studienvisiten war die Signifikanz vor allem zwischen dem zweiten und fünften Studienbesuch zu beobachten.

Da der Fokus dieser Arbeit auf den eosinophilen Granulozyten liegt, wurden die detaillierten statistischen Ergebnisse für die weiteren Zelltypen nicht graphisch in dieser Arbeit dargestellt.

Zusammenfassend konnte damit beobachtet werden, dass die Becherzellen ( $p < 0,01$ ) im zeitlichen Verlauf der Studienvisiten unter Dupilumab-Therapie signifikant gestiegen sind und die eosinophilen Granulozyten ( $p < 0,0001$ ) und Lymphozyten ( $p < 0,01$ ) signifikant gesunken sind. Die Signifikanz war dabei umso höher, je weiter die einzelnen Studienvisiten voneinander entfernt waren. Bezüglich der Flimmerzellen und der neutrophilen Granulozyten konnte keine signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

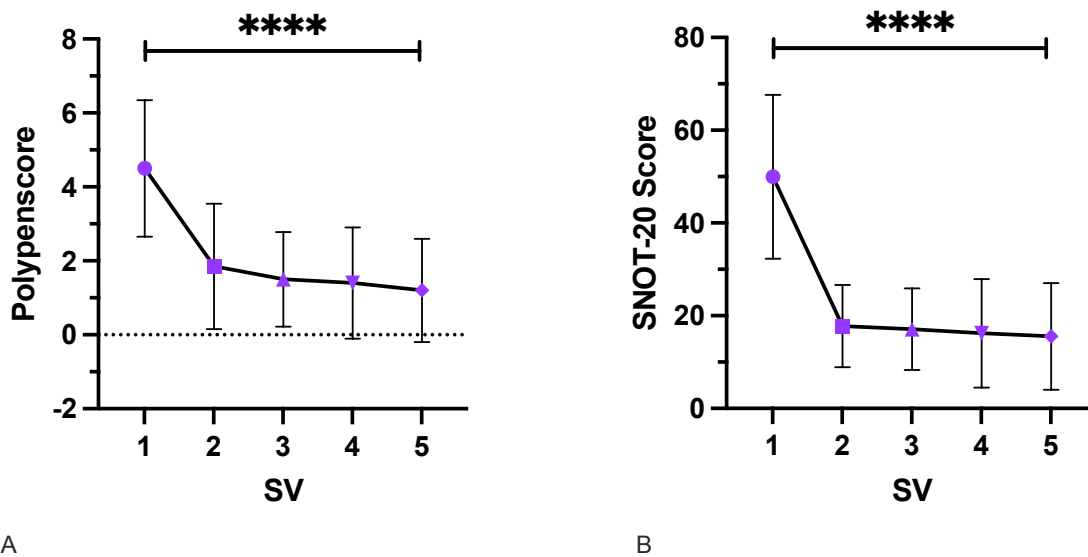
## 4.3.2 Auswertung der Blutuntersuchung



**Abbildung 34 Auswertung von Serum-IgE Werten und dem prozentualen Eosinophilenanteil im Differentialblutbild im zeitlichen Verlauf.** A: Serum-IgE in IU/ml (Friedman-Test), B: Eosinophile Granulozyten in % im Differentialblutbild; SV, Studienvisite. Der Whisker zeigt die Standardabweichung und die mittlere Markierung den Mittelwert. Der p-Wert ist mit dem Symbol \*\*\*\* für  $p < 0,0001$  gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der Blutuntersuchungen im zeitlichen Verlauf dargestellt, wobei in einzelnen die Serum-IgE Konzentration (in IU/ml) und die eosinophilen Granulozyten im Differentialblutbild (in %) betrachtet wurden. Bezüglich der Serum-IgE Werte konnte eine deutliche Abnahme festgestellt werden, die sich im Friedman-Test auch als signifikant ( $p < 0,0001$ ) bestätigen ließ. Auch hier zeigte sich, dass die Signifikanz umso höher war, je weiter die Studienvisiten voneinander entfernt waren. Die eosinophilen Granulozyten zeigten einen eher unregelmäßigen Verlauf und es konnte im Friedman-Test keine signifikante Tendenz festgestellt werden.

## 4.3.3 Polypenscore und SNOT-20 Fragebogen



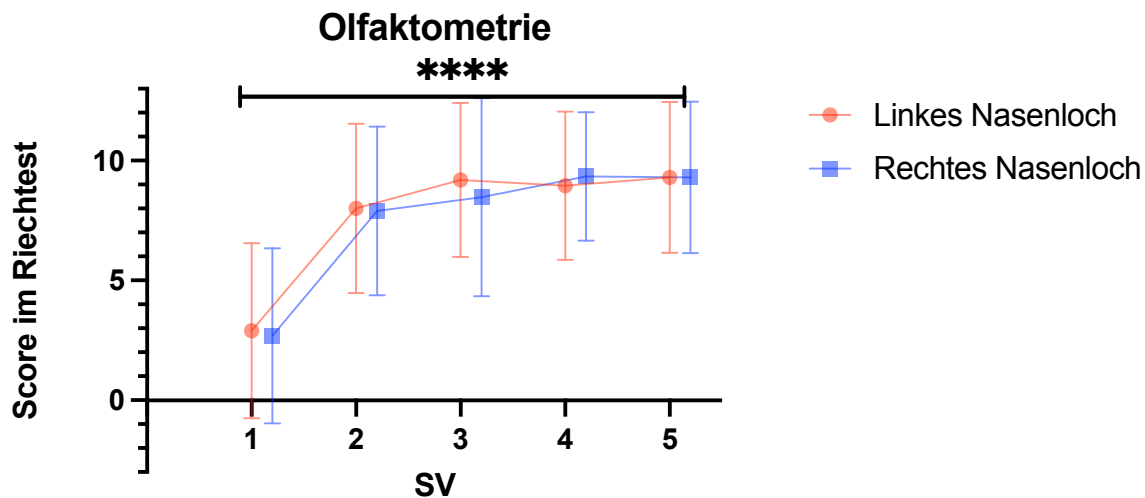
**Abbildung 35 A: Polypenscore (Friedman-Test), B: SNOT-20 Fragebogen (Friedman-Test);** SV, Studienvisite. Der Whisker zeigt die Standardabweichung und die mittlere Markierung den Mittelwert. Die p-Werte sind mit den Symbolen \*\*\*\* für  $p < 0,0001$  gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Auch im Polypenscore ( $p < 0,0001$ ) und im SNOT-20 Fragebogen ( $p < 0,0001$ ) zeigte sich ein jeweils hochsignifikantes Sinken der jeweiligen Parameter im zeitlichen Verlauf der Studienvisiten (Friedman-Test). Besonders deutlich wurde, dass die größte Differenz bei beiden Parametern gerade zu Beginn der Therapie (zwischen SV1 und SV2) festzustellen ist (s. Abbildung 35).

Bezüglich des Polypenscores war ein Mittelwert von 5 [95% KI: 3,63; 5,37] bei der ersten Studienvisite zu beobachten, der schon bei der zweiten Studienvisite bei 1,5 [95% KI: 1,06; 2,64] und bei der fünften Studienvisite bei 1 [95% KI: 0,55; 1,86] lag. Beim SNOT-20 Fragebogen betrug der Mittelwert zu Beginn 52,5 [95% KI: 41,68; 58,22] und bei der zweiten Studienvisite 15 [95% KI: 13,6; 21,9], um dann bei der fünften Studienvisite weiter auf 11,5 [95% KI: 10,17; 20,93] zu fallen.



#### 4.3.4 Auswertung der Olfaktometrie

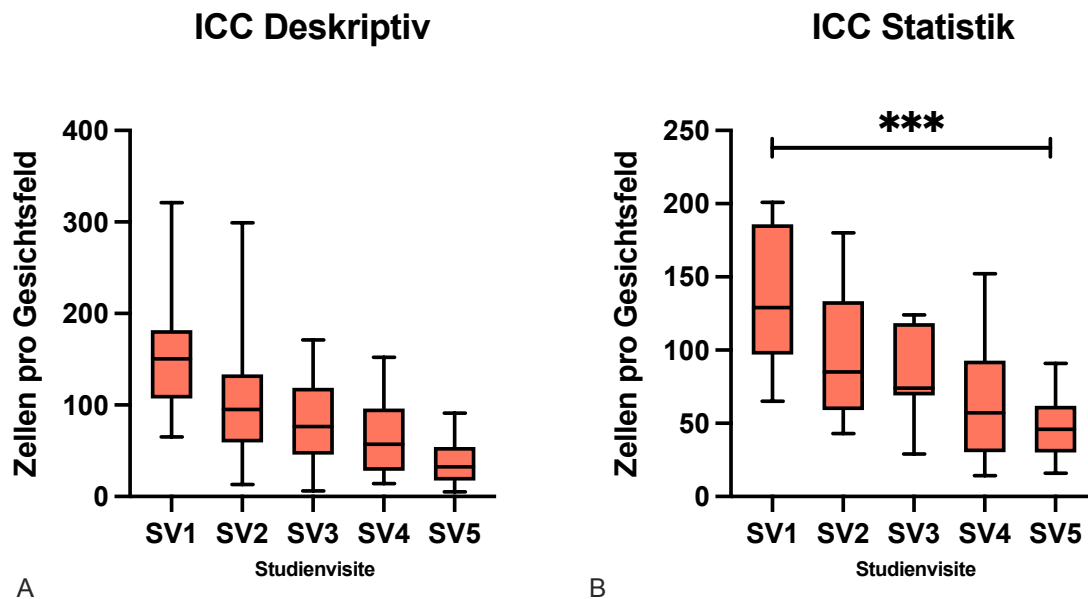


**Abbildung 36 Auswertung der Riechtests;** SV, Studiervisite. Der Whisker zeigt die Standardabweichung und die mittlere Markierung den Mittelwert. Der p-Wert ist mit dem Symbol \*\*\*\* für  $p < 0,0001$  gekennzeichnet. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Auswertung der 12er-SNIFFIN-Stick Tests ergab eine Verbesserung der Riechfähigkeit im zeitlichen Verlauf der Studiervisiten. Es war eine nahezu identische Zunahme der erkannten Gerüche sowohl auf der linken als auch der rechten Nasenseite zu beobachten, die im Friedman-Test auch signifikant war ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.3.5 Auswertung der immunzytochemischen Färbungen

Die zuvor gefärbten MGG-Präparate wurden anhand im Vorfeld etablierter Standardprotokolle immunhistochemisch mit einem Antikörper umgefärbt, um zu ermitteln, ob der Verlauf der eosinophilen Zellzahl noch exakter darzustellen ist. Um den Patienten einem möglichst geringen Aufwand auszusetzen, wurden hierfür die bereits ausgewerteten MGG-Präparate genutzt. Von insgesamt 100 Präparaten (20 Patienten mal 5 Studiervisiten) konnten wir 80 ICC-Präparate (80 %) erfolgreich auswerten. 20 von 100 Präparaten (20 %) ergaben nach der Färbung Präparate, die nicht spezifisch reagiert hatten.

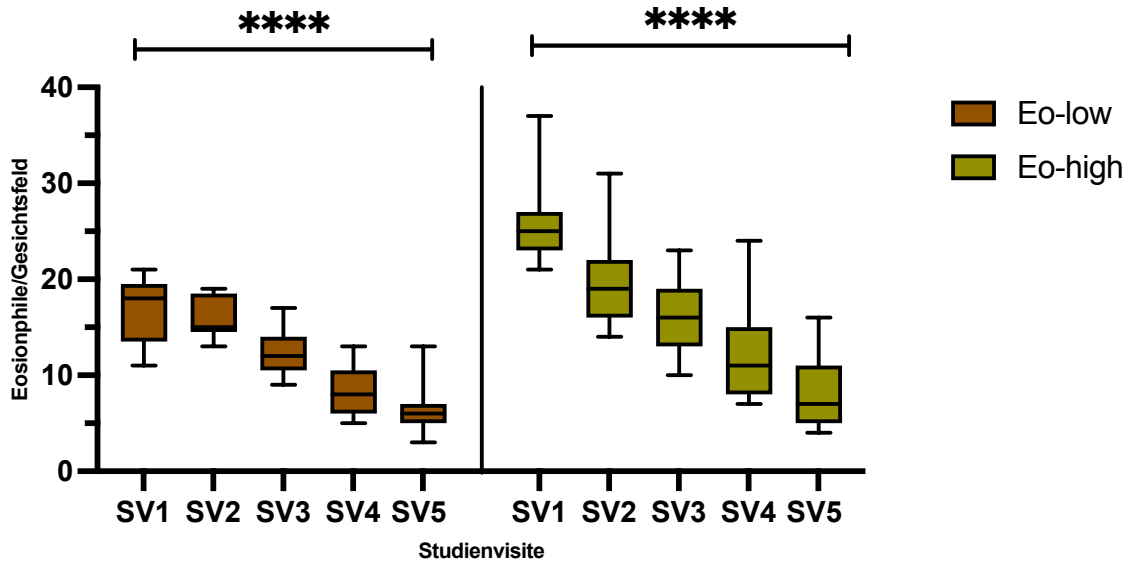


**Abbildung 37 Auswertung der Immunzytochemischen Färbung im Verlauf, A: Deskriptive Statistik, B: Statistische Auswertung.** Die Box kennzeichnet die mittleren 50 % der Werte, begrenzt von dem unteren und oberen Quartil (25 %- und 75 %-Quantil). Der Median ist als horizontaler Strich in der Box dargestellt. Der Whsiker (vertikaler Strich) stellt die Verbindung zwischen den extremen Nicht-Ausreißer-Werten dar. Der P-Wert ist mit \*\*\* für  $< 0,001$  gekennzeichnet.

So kommt es, dass man in Abbildung 37 Graph A die deskriptive Statistik erkennen kann, in der alle in die Studie eingeschlossenen Patienten dargestellt sind und in Graph B nur die Patienten dargestellt sind, deren Präparate in allen Studienvisiten erfolgreich gefärbt wurden. Nachdem die Werte auf Normalverteilung getestet wurden (D'Agostino & Pearson Test, Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test, Kolmogorov-Smirnov Test) wurde der One-way ANOVA Test durchgeführt, der ein hochsignifikantes Ergebnis ( $p = 0,0004$ ) lieferte. Da in der Datensammlung der deskriptiven Statistik Lücken zu finden sind, konnte dort kein statistischer Test angewandt werden.

#### 4.4 Unterteilung des Patientenkollektivs anhand der eosinophilen Granulozyten in eine Eo-low und Eo-high Gruppe

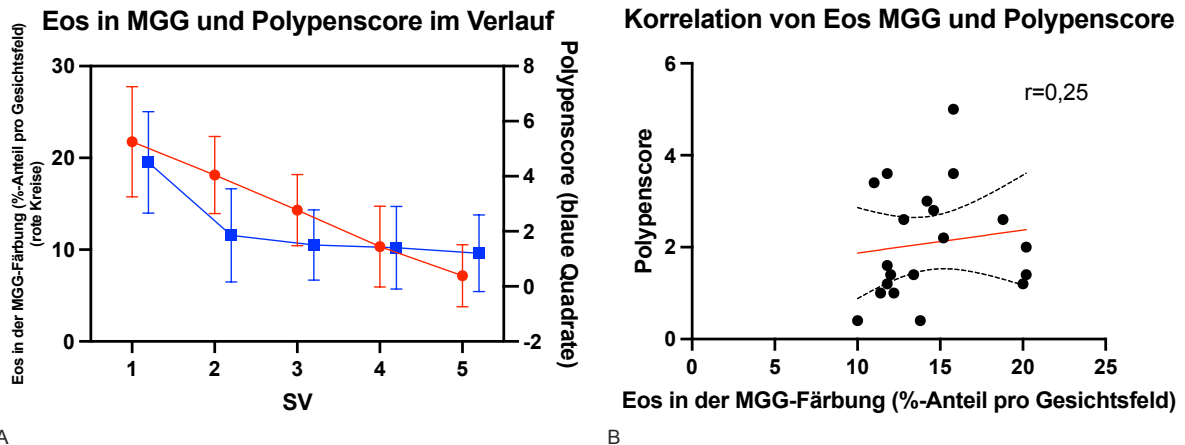
Der Median der Eosinophilen Granulozyten in der MGG-Auswertung beim ersten Studienbesuch beträgt 21 %. Wenn man nun die Patienten unter- bzw. oberhalb des Medians bzgl. der jeweiligen Veränderungen im zeitlichen Verlauf vergleicht, lässt sich erkennen, dass der Abfall der eosinophilen Granulozyten im Verlauf in der Eo-high-Gruppe stärker ist als in der Eo-low-Gruppe ( $\Delta$ SV1-SV5 = 17,822 (Eo-high) vs. 10,67 (Eo-low)) (s. Abbildung 38). Der Friedman Test wurde angewendet, um die Signifikanz zu prüfen und ergab in beiden Gruppen ein hochsignifikantes Ergebnis.



**Abbildung 38 Eo-low (links, braun) vs Eo-high (rechts, grün) im Verlauf;** Die Patienten wurden anhand ihres Eosinophilen-Anteils in der ersten Studienvisite und dem Median von 21% in die Gruppen Eo-low und Eo-high eingeteilt. Die Box kennzeichnet die mittleren 50 % der Werte, begrenzt von dem unteren und oberen Quartil (25 %- und 75 %-Quantil). Der Median ist als horizontaler Strich in der Box dargestellt. Der Whisker (vertikaler Strich) stellt die Verbindung zwischen den extremen Nicht-Ausreißer-Werten dar. Die P-Werte sind mit \*\*\*\* für  $<0,0001$  gekennzeichnet.

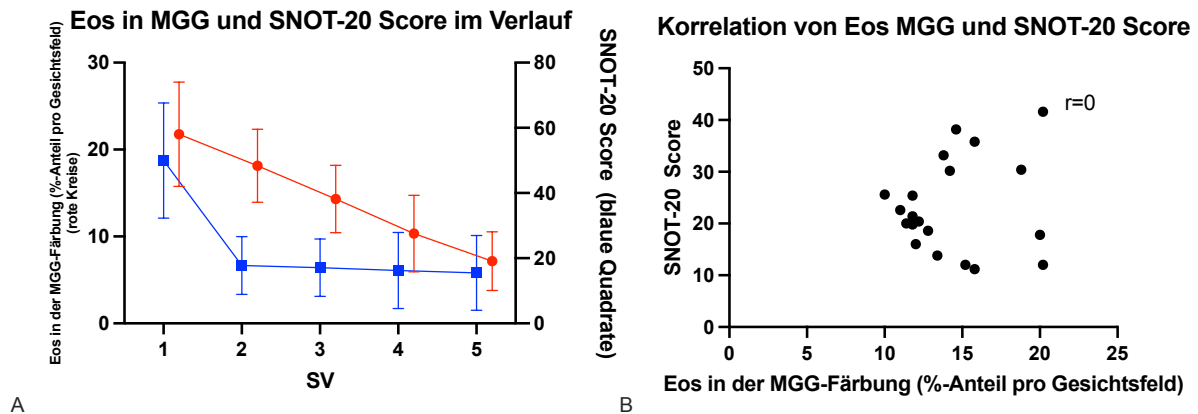
#### 4.5 Korrelation der einzelnen Parameter

In Abbildung 39 ist der Zusammenhang zwischen den eosinophilen Granulozyten in der MGG-Färbung und dem Polypenscore veranschaulicht. Der Spearman Korrelations-Koeffizient ergab mit  $r = 0,25$  eine schwach positive Korrelation und kein signifikantes Ergebnis ( $p > 0,05$ ).



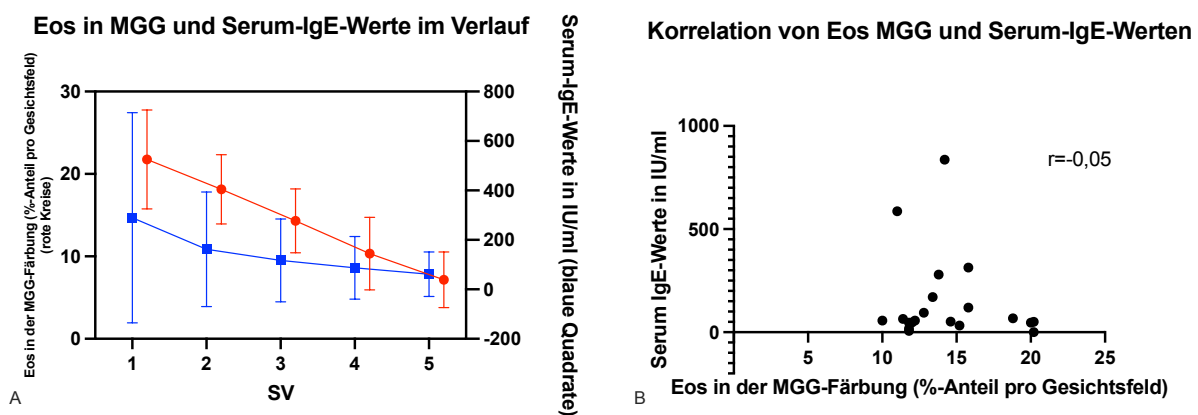
**Abbildung 39 A: Eosinophile Granulozyten in der MGG-Färbung (in %, rote Kreise) vs. Polypenscore (blaue Quadrate).** Der Verlauf der jeweiligen Werte wurde graphisch dargestellt. Der Whisker zeigt die Standardabweichung und die mittlere Markierung den Mittelwert. SV: Studienvisite. **B: Korrelation der Eosinophilen Granulozyten in der MGG-Färbung (%-Anteil pro Gesichtsfeld) und dem Polypenscore.** Als Test wurde der Spearman Korrelations-Koeffizient Test genutzt ( $r = 0,29$ ). Die Korrelation ergab kein signifikantes Ergebnis ( $p > 0,05$ ). Die rote Linie gibt die lineare Regression an ( $Y = 0,04982 * X + 1,376$ ).

Die folgende Abbildung (Abbildung 40) zeigt den Zusammenhang zwischen den eosinophilen Granulozyten in der MGG-Färbung und den Ergebnissen im SNOT-20 Fragebogens. Es zeigte sich keine Korrelation ( $r=0$ ) und kein signifikantes Ergebnis ( $p=0,4$ ).



**Abbildung 40 A: Eosinophile Granulozyten in der MGG-Färbung (in %, rote Kreise) vs. SNOT-20-Score (blaue Quadranten).** Der Verlauf der jeweiligen Werte wurde graphisch dargestellt. Der Whisker zeigt die Standardabweichung und die mittlere Markierung den Mittelwert. SV: Studienvisite. **B: Korrelation der Eosinophilen Granulozyten in der MGG-Färbung (%-Anteil pro Gesichtsfeld) und dem SNOT-20-Score.** Als Test wurde der Spearman Korrelations-Koeffizient Test genutzt ( $r=0$ ). Es zeigte sich kein signifikantes Ergebnis ( $p>0,05$ ).

Auch der Zusammenhang zwischen den eosinophilen Granulozyten in der MGG-Färbung und den Serum-IgE-Werten wurde verglichen. Dabei stellte sich keine signifikante Korrelation heraus (s. Abbildung 41).



**Abbildung 41 A: Eosinophile Granulozyten in der MGG-Färbung (in %, rote Kreise) vs. Serum-IgE-Werte (in IU/ml, blaue Quadranten).** Der Verlauf der jeweiligen Werte wurde graphisch dargestellt. Der Whisker zeigt die Standardabweichung und die mittlere Markierung den Mittelwert. SV: Studienvisite. **B: Korrelation zwischen Serum-IgE-Werten (IU/ml) und den eosinophilen Granulozyten in der MGG-Färbung (%-Anteil pro Gesichtsfeld).** Der Spearman Korrelations-Koeffizient ergab  $r=-0,05$ . Es zeigte sich kein signifikantes Ergebnis ( $p>0,05$ ).

## 4.6 Untersuchung des Therapieansprechens

Um zu untersuchen, ob ein klinisches Ansprechen mit den Ergebnissen der MGG-Färbung korreliert, wurden zunächst die Differenzen der jeweiligen Parameter in der ersten und letzten Studienvisite berechnet. Der SNOT-20-Score wurde dabei als Maß für ein subjektiv empfundenes Ansprechen des Patienten gewertet und der Polypenscore als ein objektiv bestimmtes Maß des Arztes. Die Differenz wurde folgendermaßen berechnet:

$$\Delta\text{SNOT-20-Score} = \text{SV5} - \text{SV1} \qquad \text{Median: } -36$$

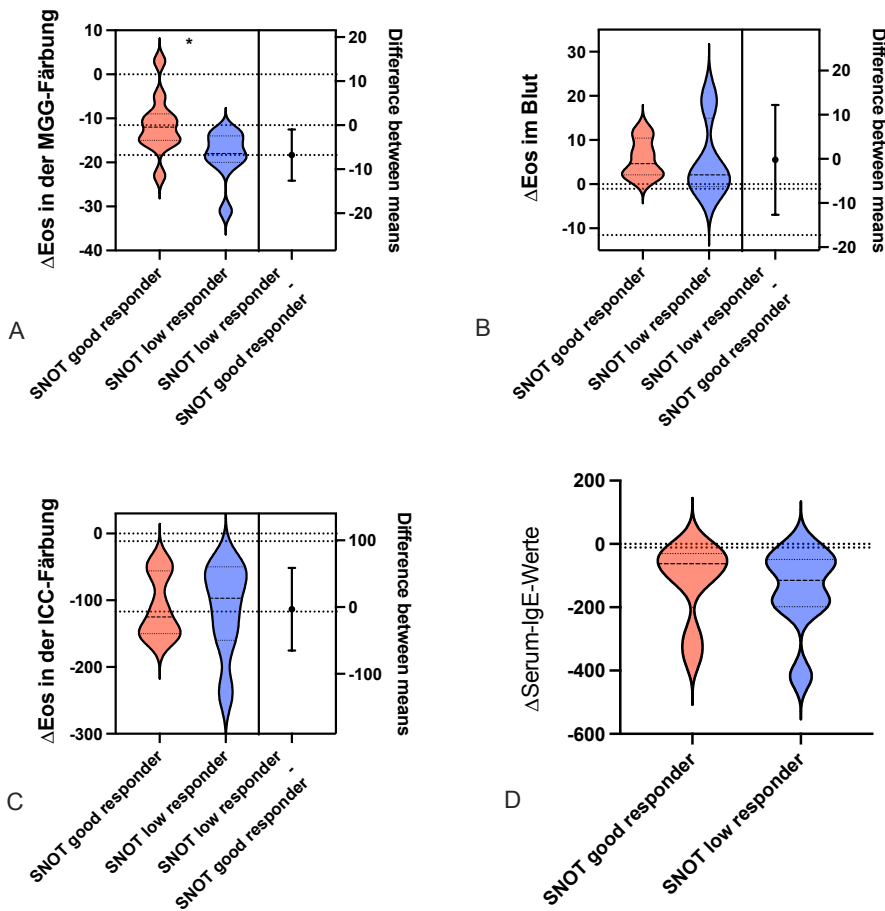
$$\Delta\text{Polypenscore} = \text{SV5} - \text{SV1} \qquad \text{Median: } -3$$

Anschließend wurde der Median aller Differenzen bestimmt.

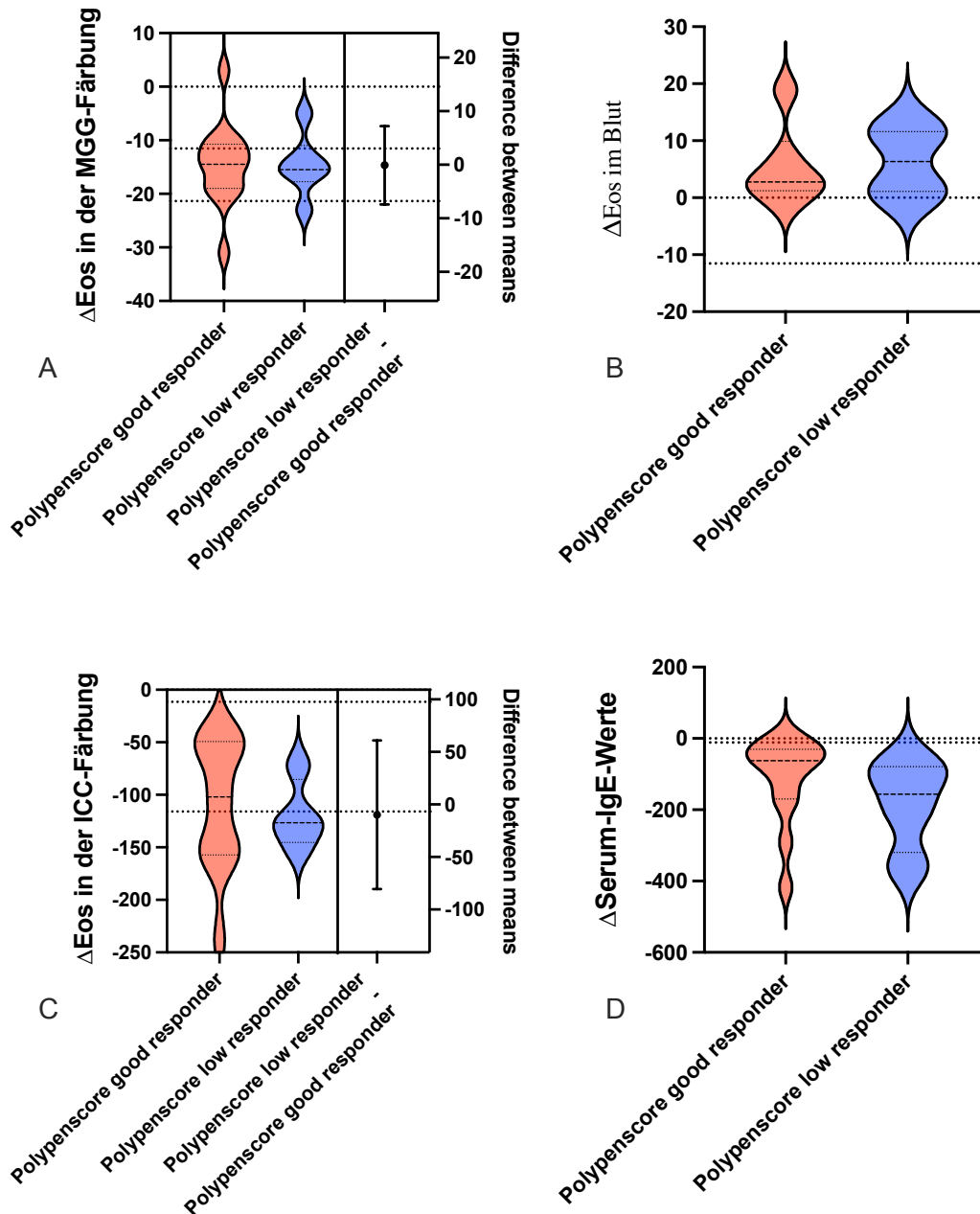
So können nun alle Patienten die eine größere oder gleiche Abnahme um den Median aufweisen in eine „good responder“-Gruppe eingeteilt werden und alle Patienten, die eine geringere Abnahme zeigen, in eine „low-responder“-Gruppe.

Die jeweiligen Patienten werden dann bezüglich der Differenz der eosinophilen Granulozyten in der MGG-Färbung in den beiden Gruppen verglichen. Bei einer Normalverteilung wurde ein t-Test durchgeführt, bei keiner Normalverteilung der Mann-Whitney-U-Test.

Abbildung 42 zeigt nun die verschiedenen Ergebnisse bezüglich der „SNOT good responder“- und „SNOT low responder“-Gruppe und Abbildung 43 die Ergebnisse bezüglich der „Polypscore good responder“ und „Polypscore low-responder“.



**Abbildung 42** Die Graphen vergleichen verschiedene Parameter zwischen SNOT good-respondern und low-respondern anhand von Estimation plots. Angezeigt sind die jeweiligen Daten mit ihren Konfidenzintervallen im linken Teil der Graphen in Form von Geigendiagrammen und die Effektstärke mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen auf der rechten Seite der Graphen (nur für t-tests möglich). A: Dargestellt sind  $\Delta$ Eosinophile in der MGG-Färbung im Vergleich. Ein ungepaarter t-test wurde durchgeführt und ergab mit  $p=0,025$  ein signifikantes Ergebnis; B: Dargestellt sind  $\Delta$ Eosinophile im Differentialblutbild im Vergleich. Ein ungepaarter t-test wurde durchgeführt und ergab mit  $p>0,05$  kein signifikantes Ergebnis; C: Dargestellt sind  $\Delta$ Eosinophile in der ICC-Färbung im Vergleich. Ein ungepaarter t-test wurde durchgeführt und ergab mit  $p>0,05$  kein signifikantes Ergebnis; D: Dargestellt sind  $\Delta$ Serum-IgE-Werte im Vergleich. Ein Mann-Whitney-U-test wurde durchgeführt und ergab mit  $p>0,05$  kein signifikantes Ergebnis.



**Abbildung 43** Die Graphen vergleichen verschiedene Parameter zwischen Polypenscore good-responder und low-responder anhand von Estimation plots. Angezeigt sind die jeweiligen Daten mit ihren Konfidenzintervallen im linken Teil der Graphen in Form von Geigendiagrammen und die Effektstärke mit den entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen auf der rechten Seite der Graphen (nur für t-tests möglich). A: Dargestellt sind  $\Delta$ Eosinophile in der MGG-Färbung im Vergleich. Ein ungepaarter t-test wurde durchgeführt und ergab mit  $p > 0,05$  kein signifikantes Ergebnis; B: Dargestellt sind  $\Delta$ Eosinophile im Differentialblutbild im Vergleich. Ein ungepaarter t-test wurde durchgeführt und ergab mit  $p > 0,05$  kein signifikantes Ergebnis; C: Dargestellt sind  $\Delta$ Eosinophile in der ICC-Färbung im Vergleich. Ein ungepaarter t-test wurde durchgeführt und ergab mit  $p > 0,05$  kein signifikantes Ergebnis; D: Dargestellt sind  $\Delta$ Serum-IgE-Werte im Vergleich. Ein Mann-Whitney-U-test wurde durchgeführt und ergab mit  $p > 0,05$  kein signifikantes Ergebnis.

## 4.7 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse

Es zeigte sich sowohl in der MGG- ( $p < 0,0001$ ) als auch in der ICC- Auswertung ( $p < 0,001$ ) eine signifikante Abnahme der Eosinophilen-Zellzahl im Therapieverlauf. Außerdem zeigte sich, dass das Ergebnis statistisch signifikanter war, je weiter die einzelnen Studienvisiten voneinander entfernt waren. In der MGG-Färbung konnte beobachtet werden, dass die Becherzellen im zeitlichen Verlauf der Studienvisiten unter Dupilumab-Therapie signifikant gestiegen sind ( $p < 0,01$ ) und die eosinophilen Granulozyten ( $p < 0,0001$ ) und Lymphozyten ( $p < 0,01$ ) signifikant gesunken sind. Die Signifikanz war dabei ebenfalls umso höher, je weiter die einzelnen Studienvisiten voneinander entfernt waren. Bezüglich der Flimmerzellen und der neutrophilen Granulozyten konnte keine signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Bei der Einteilung der MGG-Präparate in eine Eo-low ( $< 21\%$ ) und Eo-high-Gruppe ( $\geq 21\%$ ) anhand der prozentualen eosinophilen Zellzahl vor Therapiebeginn, zeigte die Eo-high-Gruppe eine stärkere Abnahme ( $\Delta 17,82$ ) im Vergleich zu der Eo-low-Gruppe ( $\Delta 10,67$ ). Auch der Polypenscore, der SNOT-20 Fragebogen und die Gesamt-IgE-Konzentration zeigten jeweils eine signifikante Abnahme im Verlauf ( $p < 0,0001$ ). Dabei zeigte sich die größte Differenz gerade zu Beginn der Therapie. Bezüglich der Eosinophilen im Differentialblutbild zeigte sich kein signifikantes Ergebnis, da die Werte zunächst stiegen und dann ab der dritten Studienvisite wieder fielen. Bei der Korrelation der einzelnen Werte untereinander (MGG vs. Polypenscore; MGG vs. SNOT-20-Fragebogen; MGG vs. Serum-IgE-Werte) zeigte sich trotz tendenzieller Korrelation in den Graphen kein signifikantes Ergebnis. Anhand des Medians der durchschnittlichen Veränderung im Polypenscore und im SNOT-20 Fragebogen wurden die Patienten in "good-responder" und "low-responder" eingeteilt. Anschließend wurden beide Gruppen bezüglich der Eosinophilen im Nasenabstrich, den Eosinophilen im Differentialblutbild und dem Gesamt-IgE-Wert verglichen, wobei kein signifikantes Ergebnis zu beobachten war.



## 5 Diskussion

Die chronische Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (CRSwNP) stellt eine der häufigsten chronischen Erkrankungen in unserer Gesellschaft dar, wobei die Prävalenz tendenziell weiter ansteigt und man davon ausgehen kann, dass die Dunkelziffer noch höher ist (CHAABAN et al., 2013). Die genaue Ätiologie ist noch unklar und Gegenstand aktueller Forschungen, es wird aber eine Host-Environment-Hypothese angenommen, die zu einer chronischen Inflammation und Schädigung der Nasenschleimhaut führt (KERN et al., 2008). In 80 % der CRSwNP-Fälle ist eine chronische Typ-2-Infektion nachzuweisen (CHAABAN et al., 2013; KATO, 2015; MILONSKI et al., 2015). Es wurden außerdem Assoziationen mit einem Asthma bronchiale oder einer Allergie beobachtet- beides Komorbiditäten, die ebenfalls mit einer Typ-2-Inflammation einhergehen (HEDMAN et al., 1999; ROSENFELD, 2007; TOMASSEN et al., 2016; ZHANG et al., 2017). Auch wir stellten in unserer Studie diese Komorbiditäten fest. Betroffene Patientinnen und Patienten zeigen einen enormen Leidensdruck, da die Symptome die Lebensqualität und die Leistungsfähigkeit stark einschränken (KHAN et al., 2019; MILONSKI et al., 2015). Nicht nur die blockierte Nasenatmung und das starke Druckgefühl durch die Polypen stellen ein Problem dar, sondern auch die Auswirkungen, die damit einhergehen, wie zum Beispiel Riech- und Schlafstörungen (BACHERT et al., 2014; CHUNG et al., 2015; KOHLI et al., 2017). Da Polypen langsam wachsen, gewöhnen sich Betroffene meistens an diese Beschwerden und suchen erst spät einen Arzt auf, wenn die Lebensqualität schon sehr stark eingeschränkt ist. Das ist der Grund, warum eine rein medikamentöse Therapie meistens nicht mehr ausreicht und Polypen meist nur noch operativ im Rahmen einer FESS entfernt werden können (KIM et al., 2021). Eine Operation bringt allerdings das Risiko postoperativer Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, Wundinfektionen oder Lungenarterienembolien mit sich und durch die anatomische Lage sind orbitale und intrakranielle Komplikationen möglich (HOSEMANN, DRAF, 2013). Es ist außerdem bekannt, dass die Rezidivrate nach einer FESS mit 60% immer noch sehr hoch ist, wodurch nicht selten mehrfache Nasennebenhöhlenoperationen im Krankheitsverlauf notwendig werden (DECONDE et al., 2017; ROSATI et al., 2020; TEVIS, KENNEDY, 2013). Vor allem Patienten mit Komorbiditäten wie Asthma bronchiale oder einer Aspirinintoleranz neigen dabei zur Entwicklung von Rezidiven (LOFTUS et al., 2020; MENDELSON et al., 2011; ROSATI et al., 2020). Jeder Behandlungsverlauf wird daher individuell auf den Patienten abgestimmt und nicht selten sind mehrere Therapieansätze nötig. Für CRSwNP Patienten, die ein Rezidiv trotz leitliniengerechter Therapie einschließlich einer FESS entwickeln, welches

nicht suffizient durch weitere Operationen und/oder systemische Cortisongaben beherrscht werden kann, kann der Einsatz von Biologika als Therapieoption erwogen werden. Diese innovative Therapieform, die erst seit wenigen Jahren zur Behandlung von CRSwNP Patienten zur Verfügung steht, blockiert zielgerichtet einzelne molekulare Signalwege im Körper. Je nach Endotyp sind derzeit drei Biologika in der Therapie der CRSwNP zugelassen, wobei Dupilumab einer davon ist, der speziell die IL-4-Rezeptor- $\alpha$ -Untereinheit blockiert (BACHERT et al., 2019; JONSTAM et al., 2019). Durch die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Interleukine 4 und 13 wird das Signaling beider Schlüsselenzyme der Typ-2-Entzündung blockiert und die damit einhergehenden Symptome gelindert. Dupilumab ist als Fertigspritze verfügbar und kann vom Patienten selbstständig alle zwei Wochen subkutan appliziert werden. Eine Therapie mit Dupilumab ist mit ca. 20.000 Euro Therapiekosten pro Patient und Jahr sehr teuer weshalb es dringend erforderlich ist, Patienten gezielt identifizieren zu können, die von einer Therapie mit dem Antikörper am wahrscheinlichsten profitieren (BACHERT et al., 2021; BUNDESAUSSCHUSS, 2019). Nach einheitlicher Meinung der bisher zur Anwendung von Dupilumab in den verschiedenen Indikationen publizierten Studien stellt der Nachweis einer Typ-2-Entzündung den wesentlichen prädiktiven Marker dar, was auch in den Formulierungen der Zulassungsberichte der EMA entsprechend berücksichtigt wird (FOKKENS et al., 2020). Bisher stehen hierzu allerdings nur Surrogatparameter wie die Serum-IgE-Konzentration oder aber invasive Untersuchungen wie die histologische Analyse des Polypengewebes zur Verfügung, so dass die Suche nach geeigneten Biomarkern, die eine Prädiktion des Therapieansprechens und ein Therapiemonitoring ermöglichen, von großem Interesse für das klinische Management ist (ROBINSON et al., 2017). Vor diesem Hintergrund stellt die nasale Abstrichzytologie eine günstige und nicht-invasive Methode dar, um im Rahmen einer ambulanten Vorstellung der Patienten und ohne die Notwendigkeit einer Narkose, potentiell Aussagen über das Therapieansprechen und den Therapieverlauf geben zu können. Vor diesem Hintergrund wurde die im Rahmen dieser Doktorarbeit vorgestellte Studie konzipiert, deren zuvor dargestellte Ergebnisse nun im Detail vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur diskutiert werden sollen.

## 5.1 Untersuchung der Nasenabstriche

Im Rahmen der Studie wurden 20 Patientinnen und Patienten innerhalb eines Jahres insgesamt fünfmal im Abstand von 12 Wochen nasal abgestrichen und der prozentuale Anteil der Zellen der Nasenschleimhaut ausgewertet. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Eosinophilenzellzahl im Nasenabstrich im Verlauf. Nach Betrachtung methodischer Aspekte der Ana-

lyse der MGG und ICC Präparate, stellt sich zunächst die Frage, wie die experimentell nachgewiesene Abnahme der Eosinophilenzellzahl in den untersuchten Nasenabstrichen in den Kontext der bisherigen Erkenntnisse über Eosinophilie bei CRSwNP sowie die natürliche Variation der Eosinophileninfiltration einzuordnen ist und ob sich die Abnahme der Zellzahl als potentieller diagnostischer Marker für ein Therapieansprechen eignet.

### 5.1.2 Technik der nasalen Abstrichzytologie

Die Technik der nasalen Abstrichzytologie geht auf erste Versuche im Jahre 1889 zurück (GELARDI et al., 2007). Man stellte damals schon fest, dass Asthma-Patienten im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der Nasenschleimhaut aufweisen (GELARDI et al., 2007). Im Jahre 1927 stellte man diesen Nachweis auch bei Allergiepateinten fest (FERRARA et al., 2012). Rutland et al. beschrieben 1980 erneut die nicht-invasive Methode, um nasale Epithelzellen zu gewinnen und an der Zilienschlagfrequenz im Zusammenhang mit der Mukoviszidose und der Ziliendyskinesie zu forschen (RUTLAND, COLE, 1980). Bis dato wurde nasales Gewebe hauptsächlich durch Biopsien entnommen, wobei der Patient sediert werden musste. Schon damals sahen die Forscher den hohen Nutzen der nasalen Abstrichzytologie bezüglich chronischer Nasen- und Lungenerkrankungen (BRIDGES et al., 1991; RUTLAND et al., 1982). Seitdem wurden weitere Forschungen betrieben und es stellte sich heraus, dass die nasale Abstrichzytologie einen potentiell großen Nutzen in der Rhinologie aufweist. So konnte beispielweise mithilfe der nasalen Abstrichzytologie die nicht-allergische Rhinitis besser charakterisiert und in verschiedene Subtypen unterteilt werden: nicht-allergische Rhinitis mit eosinophilen Zellen (NARES), mit Mastzellen (NARMA), mit neutrophilen Granulozyten (NARNE) oder gemischten Zellen (NARESMA) (GELARDI et al., 2016). In der klinischen Rhinologie hat sich diese Klassifikation auf Basis der nasalen Abstrichzytologie jedoch nicht durchsetzen können. Anhand von klinischen und zytologischen Kriterien veröffentlichten Gelardi et al 2017 auch ein Clinical-Cytological Grading der CRSwNP-Patienten in drei Gruppen, um den prognostischen Index eines Rückfalls an Nasenpolypen zu bestimmen: low ( $\leq 3$ ), medium (4-6), high ( $\geq 7$ ) (GELARDI et al., 2017). Der Score stellt sich zusammen aus klinischen Komorbiditäten (1: ASS-Intoleranz; 2: Asthma; 3: Allergie; 3: ASS-Intoleranz und Asthma) und dem zytologisch dominierendem Zellbild (1: neutrophile Granulozyten; 1: Mastzellen; 2: eosinophile Granulozyten; 4: eosinophile Granulozyten und Mastzellen). Ein höheres Ergebnis im Clinical-Cytological Grading bedeutet eine höhere Wahrscheinlichkeit, ein Polypen-Rezidiv zu erleiden und damit eine Operation zu benötigen. Tatsächlich fanden Gerladi et al. nach einem Follow-up von 5 Jahren heraus, dass die Patienten in

der „low“ Gruppe signifikant weniger Operationen benötigten, als Patienten in der „high“ Gruppe (GELARDI et al., 2017). Dieses eindruckliche Ergebnis lässt erkennen, wie wertvoll die Forschung an Nasenabstrichen für die Zukunft der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde sein kann. Denn die nasale Abstrichzytologie bietet eine einfache, nicht-invasive und schmerzfreie Methode, um nasale Epithelzellen zu gewinnen (RUTLAND, COLE, 1980). Außerdem wird die Methode gut von den Patienten toleriert und es wird keine Anästhesie benötigt (BRIDGES et al., 1991). Bei Bedarf kann die Nase lokal mit beispielweise Lidocain betäubt werden (RUTLAND, COLE, 1980). Es wurden nur geringe Irritationen der Schleimhaut festgestellt, die in wenigen Fällen ein Niesen oder eine kleinere Blutung verursachten (BRIDGES et al., 1991). Somit stellt die nasale Abstrichzytologie eine Methode dar, die in allen Altersklassen, auch bei Kindern, und vor allem wiederholt genutzt werden kann (CARUSO et al., 2022).

In der Gynäkologie wird die Abstrichzytologie bereits seit vielen Jahren genutzt. Dort wird sie in der Diagnostik zur Früherkennung des Zervixkarzinoms angewendet (GIBB, MARTENS, 2011). Auch in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde gibt es Versuche, die Zytologie der Mundschleimhaut mittels Abstrichen zu untersuchen, um Hinweise auf Mundhöhlenkarzinome zu erlangen (BROCKLEHURST et al., 2013; PARK et al., 2016).

Da die Nasenschleimhaut ebenfalls gut erreichbar ist, stellt sie eine gute Möglichkeit dar, die Zellveränderungen des nasalen Epithels als diagnostisches Werkzeug zu nutzen und diagnostische Rückschlüsse über beispielweise entzündliche Vorgänge treffen zu können (FERRARA et al., 2012; GELARDI et al., 2007). Aus technischer Sicht wird empfohlen den mittleren Abschnitt der unteren Nasenmuschel abzustreichen, da dort das Flimmerzellen/Becherzellen-Verhältnis am ehesten ausgeglichen erwartet wird (GELARDI et al., 2018a; GELARDI et al., 2016). Dies ist der aktuelle Standard. Boccioloni et al veröffentlichten 2022 allerdings eine Studie, in der sie zeigten, dass die mittlere Nasenmuschel besser im Hinblick auf eine valide zytologische Auswertung geeignet ist (BOCCIOLINI et al., 2022). Da dies jedoch ein neuer Ansatz ist, gibt es noch nicht viele Quellen dazu und es sind leider auch kaum Studien mit dieser Methode zu finden. Es gilt zu beachten, dass die Nasenschleimhaut je nach Lokalisation Unterschiede in der Zell- und Rezeptorexpression aufweist, wie Deprez et al. 2020 in ihrer Arbeit veröffentlichten (DEPREZ et al., 2020). Mitroi et al. stellten wiederum einen Unterschied zwischen der Zell- und Rezeptorexpression von normalem Zellepithel und Polypengewebe fest (MITROI et al., 2019). So wiesen sie einen erhöhten Anteil an eosinophilen Granulozyten und T-Lymphozyten in Polypengewebe nach (MITROI et al., 2019). Aus diesem Grund spielt es eine entscheidende Rolle, wo man die Nasenschleimhaut abstreicht. Da uns vor

allein die Entzündungsprozesse im Abstrich interessierten strichen wir in unserer Studie in erster Linie vorhandene Polypen ab. Bei nicht vorhandenen Polypen strichen wir, wie die Mehrheit der aktuellen Literatur empfiehlt, den mittleren Abschnitt der unteren Nasenmuschel ab. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten achteten wir vor allem darauf, bei jedem Patienten möglichst die gleiche Lokalisation abzustreichen.

Um die Präparate herzustellen, gingen wir nach der konventionellen und bekannten Methode vor, indem wir die Abstrichbürste über ein Präparat rollten und so die Zellen gleichmäßig über das Präparat verteilten. Zuvor hatten wir auch die flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie ausprobiert, mussten aber feststellen, dass bei dem Prozess viele Zellen verloren gingen und somit keine repräsentativen Präparate gewährleistet werden konnten. Aus diesem Grund entschieden wir uns für die konventionelle Methode. Auch angesichts des praktischen Aspektes bietet diese Methode einen klaren Vorteil, da sie im ambulanten Setting einfach angewendet werden kann im Gegensatz zu der flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie.

Als bevorzugte Färbemethode wird in der Regel die May-Grünwald-Giemsa Färbung gewählt, da mit dieser Färbung die verschiedenen Zelltypen am besten dargestellt werden können (FERRARA et al., 2012; GELARDI et al., 2016). Auch wir wählten die MGG-Färbung, modifizierten sie allerdings mit 400 µl Essigsäure nach einer erfolgreichen Etablierung, um die eosinophilen Granulozyten besser darzustellen zu können. Uns half dies bei der Auswertung sehr, weshalb wir diese Methode empfehlen können. Um die eosinophilen Granulozyten noch genauer identifizieren zu können, färbten wir die MGG-gefärbten Präparate immunzytochemisch um. Bei diesem Prozess konnten wir 80 % der zuvor mit MGG- gefärbten Präparate umfärben, 20 % der Präparate wurden im Prozess beschädigt. Trotz mehrere Versuche, konnten wir den genauen Grund dafür nicht finden, vermuten aber, dass dies mit dem pH-Gehalt des Nasenschleims und die unterschiedliche Dicke der Präparate zusammenhängt. Bei der Umfärbung der granulozyten Konzentrate, an denen wir die Etablierung durchgeführt hatten, gingen keine Präparate im Färbeprozess verloren. Aus diesem Grund wissen wir, dass eine Umfärbung prinzipiell möglich ist. Es bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungen, den Grund zu finden, weshalb einige Nasenabstriche bei der Umfärbung von MGG-gefärbten zu ICC-gefärbten Präparaten nicht spezifisch reagieren.

Die natürliche Nasenschleimhaut besteht hauptsächlich aus Flimmerzellen, Becherzellen und Basalzellen und nur selten werden basophile Granulozyten und Bakterien, beispielweise bei einem Infekt, beobachtet (GELARDI et al., 2007). Deprez et al wiesen in ihrer Studie beispielweise bei gesunden Probanden ein durchschnittliches Verhältnis von 89 % an Flimmerzellen

nach (DEPREZ et al., 2020). Auch wir stellten diese Zusammensetzung in unseren mit MGG-gefärbten Präparaten fest. So überwog in der Regel der prozentuale Anteil der Flimmerzellen (s. Abbildung 32). Bei einem Infekt des Patienten beobachteten wir ebenfalls eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten.

Trotz der Erkenntnisse und dem nachgewiesenen, potentiellen klinischen Nutzen findet die nasale Abstrichzytologie aktuell keine routinemäßige Anwendung in der klinischen Praxis (REN et al., 2019; SINGHVI et al., 2019). Nur wenige Arbeitsgruppen weltweit beschäftigen sich wissenschaftlich mit der Weiterentwicklung dieser Technik und einer Ausweitung des Anwendungsspektrums (GELARDI et al., 2018b). Ciofalo et al nutzen die nasale Abstrichzytologie beispielweise, um die verschiedenen Phänotypen der Rhinitis (allergische, nicht-allergische und chronische Rhinitis) zu differenzieren (CIOFALO et al., 2022). Auch Gelardi et al forschen seit einigen Jahren an der nasalen Abstrichzytologie, da sie ebenfalls den Nutzen dieser Methode erkannt haben (GELARDI et al., 2021). Um die nasale Abstrichzytologie in der täglichen Praxis zu etablieren, sind allerdings noch weitere Forschungen mit dieser Methode nötig.

### 5.1.3 Prognostische Implikationen einer Eosinophilie bei CRSwNP

Wie bereits in der Einleitung erläutert, weisen 80 % der CRSwNP-Patienten eine Typ-2-Entzündungsreaktion auf (CHAABAN et al., 2013). Die Schlüsselenzyme sind dabei IL-4, -5 und 13, wobei IL-4 und -13 eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit aufweisen (JONSTAM et al., 2019). So sind sie beispielsweise für die Zellhyperplasie der Becherzellen und die damit einhergehende Produktion von zähem Schleim (GANDHI et al., 2016) und für die vermehrte Ausreifung der B-Zellen und der damit erhöhten Anzahl an Immunglobulin E verantwortlich (KATO, 2015; SETTIPANE et al., 2013). Außerdem induzieren beide Interleukine die Sekretion der beiden Th2-Biomarker TARC (thymus and activation-regulated chemokine) und PARC (pulmonary and activation-regulated chemokine). Im Rahmen unserer Studie ist vor allem entscheidend, dass die genannten Interleukine die Expression der „Vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1) induzieren, welche für die Adhäsion von Eosinophilen durch den VLA-4 Rezeptor verantwortlich sind (AGARWAL et al., 2020; HO et al., 2015). So kommt es zu einer vermehrten Adhäsion und Migration von Eosinophilen aus den Gefäßen zum nasalen Polypengewebe (AGARWAL et al., 2020; FULKERSON, ROTHENBERG, 2013; RANKIN et al., 2000). Aus diesem Grund ist bei den meisten CRSwNP-Patienten eine erhöhte Eosinophilen-Invasion im Polypengewebe zu finden. Die Eosinophilie der CRS-Patienten konnte auch durch Gallo et al nachgewiesen werden, indem Blutwerte, Biopsien und Abstriche von CRS-

und Kontrollpatienten miteinander verglichen wurden und ein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte (GALLO et al., 2020). Auch Zhu et al. und Mitroi et al. stellten diesen Zusammenhang fest (MITROI et al., 2019; ZHU et al., 2020). Je intensiver dabei die Inflammation ist, desto höher ist auch der Eosinophilen-Anteil im Abstrich (MYSZKOWSKA et al., 2022). Außerdem konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte eosinophilen Zellzahl mit einer schlechteren Prognose als eine nicht-eosinophile CRSwNP einhergeht (IKEDA et al., 2013). Vor diesem Hintergrund erscheint die abstrichzytologische Detektion der eosinophilen Granulozyten in der Nasenschleimhaut als eine durchaus vielversprechende Methode. In der Literatur ist eine Abnahme der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut als Zeichen der abnehmenden Typ-2 Reaktion unter Dupilumab Therapie bereits bekannt (BACHERT et al., 2019; FOKKENS et al., 2020). Ob dies auch im Gewebe der Nasenschleimhaut in ähnlicher Weise nachvollzogen werden kann, ist bisher nicht bekannt. Es ist also von entscheidendem Interesse die Patienten zu erkennen, die diese Eosinophilie aufweisen. Auch in den aktuellen Leitlinien ist unter anderem der Nachweis einer Typ-2-Inflammation anhand einer Eosinophilie im Blutbild von  $\geq 250$  Zellen/ $\mu$ l oder Serum-IgE Werte  $\geq 100$  IU/ml für die Indikation einer Dupilumab-Therapie empfohlen (FOKKENS et al., 2020; STUCK et al., 2018). Die Tatsache, dass in dem EPOS 2020 Papier eigene Kriterien entwickelt wurden, um geeignete Patienten für eine Dupilumab Therapie auszuwählen, zeigt, dass ein reines Erfüllen der Zulassungskriterien der EMA nicht ausreichend für eine zielgerichtete und effektive Patientenselektion erscheint. Zusätzliche Kriterien bzw. Marker sind erforderlich, um die wirklich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von dieser Therapie profitierenden Patienten auszuwählen. Auch angesichts der enorm hohen Kosten der Dupilumabtherapie (20 000 Euro pro Patient und Jahr) wird die korrekte Patientenselektion in Zukunft von entscheidender Bedeutung sein. Diese Ausführungen zeigen, wie komplex die molekularen Mechanismen sind, die zu einer CRSwNP führen und diesen Krankheitsprozess aufrechterhalten. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse wird entscheidend sein, um weitere Ansätze für eine zielgerichtete Therapie zu finden und die richtigen Patienten für diese Therapieansätze auf der Basis eines molekularen, prädiktiven Markerpanels auszuwählen.

In diesem Kontext ist es unser Ansatz, die Eosinophilie in der nasalen Abstrichzytologie als Biomarker zu nutzen und mit der Abnahme der Eosinophilenzellzahl sowohl in der MGG- als auch in der ICC-Auswertung den Therapieerfolg mit Dupilumab zu verfolgen. Bisher wurde die Eosinophilie durch invasiv gewonnene Untersuchungsmaterialien (z.B. histologische Untersuchung des Gewebes nach Nasennebenhöhlen-Operation, Blutentnahmen) untersucht. Die

nasale Abstrichzytologie erscheint uns durch die vorher genannten Vorteile geeigneter, vor allem aufgrund der nicht-invasiven Anwendung für den Patienten. In unserer Studie zeigte sich in den Abstrich-Präparaten eine signifikante Abnahme der Eosinophilen im Therapieverlauf, sowohl auf Grundlage der MGG- ( $p < 0,0001$ ) als auch der ICC-Färbung ( $p < 0,001$ ). Dabei stellen wir fest, dass das Ergebnis signifikanter war, je weiter die Studienvisiten voneinander entfernt waren. Außerdem beobachteten wir eine stärkere Abnahme bei Patienten, die zu Beginn sehr hohe Eosinophilen-Werte aufwiesen, also zu der Eo-high-Gruppe ( $\geq 21$  % Eosinophile in SV1) gehörten.

Aus diesem Grund kann festgestellt werden, dass die Abnahme der Eosinophilen-Konzentration in der nasalen Abstrichzytologie ein hohes Potential hat, als nicht-invasiver Biomarker für ein Therapieansprechen unter Dupilumabtherapie bei CRSwNP-Patienten genutzt zu werden. Um diesen potentiellen Nutzen weiter zu erhärten und statistisch besser belegen zu können, sind zweifelsohne weitere Studien unter Verwendung dieser Technik an deutlich größeren Patientenkollektiven erforderlich.

## 5.2 Vergleich der klinischen Ergebnisse mit dem aktuellen Stand der Literatur

Innerhalb eines Jahres stellten wir bezüglich der klinischen Parameter ähnliche Ergebnisse fest, wie sie in bisherigen aktuell veröffentlichten Studien ebenfalls zu beobachten sind. So nahm unter Dupilumab Therapie der Serum-IgE-Wert signifikant im Verlauf ab ( $p < 0,0001$ ), so wie es auch in der Zulassungsstudie und weiteren Studien zu beobachten ist ((BACHERT et al., 2019; HOFFMANN et al., 2022; IKEDA et al., 2013; JONSTAM et al., 2019; KATO, 2015; MÜLLER et al., 2022; ROBINSON et al., 2017; TOMASSEN et al., 2016; WANG et al., 2016). Die Eosinophilen Granulozyten im Differentialblutbild zeigten dagegen einen unregelmäßigen Verlauf mit einer kurzfristigen Steigung und anschließenden Abnahme nach Therapiebeginn. Auch dieses Ergebnis ist bereits in aktuellen Studien beschrieben (ABBASPOUR et al., 2022; BACHERT et al., 2019; HEIDEMANN et al., 2022). In diesem Zusammenhang gilt es, die Unterschiede einer lokalen und systemischen Inflammationen zu diskutieren. Bei einer lokalen Inflammation reagiert das Immunsystem vor Ort auf einen pathologischen Reiz, indem die Durchblutung gesteigert wird und zelluläre Abwehrmechanismen vor Ort aktiviert werden. Für die Entzündungsreaktion sind vor allem Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten verantwortlich, die Zytokine freisetzen. Die typischen Merkmale einer Inflammation sind Rötung, Überwärmung, Schwellung, Schmerz und eingeschränkte Funktion- welche bei einer lokalen Inflammation auf das lokale Gebiet beschränkt bleiben. Eine lokale Inflammation



kann beispielweise bei unzureichender Abwehrlage des Wirtes in eine systemische Inflammation übergehen (MÄRKER-HERMANN, 2013). Im Gegensatz zu einer lokalen wirkt sich eine systemische Inflammation auf den gesamten Organismus aus. Es sind erhöhte Leukozyten, ein erhöhter CRP (Akute-Phase-Protein) und in der Regel Fieber zu finden, welches sich durch den beschleunigten Stoffwechsel mit rascher Bildung von u.a. Antikörpern erklären lässt (MANGALESH et al., 2022). Die systemische Inflammation geht mit einem allgemeinen Krankheitsgefühl einher.

Eine CRSwNP ist nach diesem Verständnis in erster Linie als lokale Inflammation zu werten. Die Dupilumab-Therapie wirkt als Antikörper systemisch. Vor diesem Hintergrund lassen sich unsere Beobachtungen erklären. Durch die Blockierung des Signalwege der Interleukine-4 und -13, werden die damit einhergehenden Prozesse inhibiert- so auch die Produktion von IgE's durch Blockierung der Produktion von Antikörpern der B-Zellen. Aus diesem Grund konnte eine signifikante Abnahme von IgE's beobachtet werden, der ab Therapiebeginn zu beobachten war. Die eosinophilen Granulozyten spielen in Bezug auf die lokale Inflammation ebenfalls eine wichtige Rolle. Diese werden im Knochenmark produziert und die Wirkung der Dupilumab Therapie zeigt aus diesem Grund eine zeitliche Verzögerung der Abnahme (JONSTAM et al., 2019).

Bezüglich des Polypenscores und des SNOT-20-Scores stellten wir ebenfalls eine hochsignifikante Abnahme im Verlauf fest ( $p < 0,0001$ ), wobei der größte Unterschied zwischen dem Studienbesuch vor Therapiebeginn und dem ersten Studienbesuch nach Therapiebeginn zu beobachten war. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls in anderen Studien beobachtet und spiegelt die klinische Wirksamkeit des Antikörpers Dupilumab wider (BACHERT et al., 2019; HEIDEMANN et al., 2022; HOFFMANN et al., 2022; JONSTAM et al., 2019; KOSKI et al., 2022; SAKMEN et al., 2022). Auch die Riechfähigkeit verbesserte sich bei unseren Patienten hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) nach Therapiebeginn, was ebenfalls bereits in anderen Studien bekannt ist (BACHERT et al., 2019; FOKKENS et al., 2019; HOFFMANN et al., 2022).

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass unsere Studienteilnehmer auf die Dupilumab-Therapie mit einem klinischen Ansprechen reagierten und dieses Ansprechen mit den aktuellen Ergebnissen anderer aktueller Forschungen übereinstimmt.

### 5.3 Korrelation der einzelnen Parameter

Bezüglich der Korrelation der Werte untereinander konnten wir nur ein unzufriedenes Ergebnis feststellen. Wir konnten bezüglich der Ergebnisse in der MGG-Färbung und dem Polypenscore

nur eine geringe Korrelation ( $r=0,25$ ) nachweisen. Auch konnten wir keine Korrelation zwischen den Ergebnissen in der MGG-Färbung, dem SNOT-20 Score und den Serum-IgE-Werten feststellen. Dies, obwohl bei all diesen Parametern eine signifikante Abnahme im Verlauf festzustellen war. Dies kann sich nur dadurch erklären lassen, dass durch eine Korrelation der lediglichen Werte, viele Faktoren verloren gehen. Nur weil statistisch keine Korrelation nachgewiesen werden konnte, muss das nicht zwangsläufig bedeuten, dass kein Zusammenhang zwischen den Werten besteht. Um bessere Aussagen über die Korrelation machen zu können und statistisch besser belegen zu können, sind dementsprechend weitere Studien unter Beobachtung dieser Parameter an deutlich größeren Patientenkollektiven erforderlich.

Auch die Unterteilung der Präparate in SNOT good- und low- responder bzw. Polypenscore good- und low- responder lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Der im EPOS Papier empfohlene Parameter der Serum-IgE-Konzentration zeigte ebenfalls in unserer Studie keine Korrelation mit dem SNOT-20- und dem Polypenscore, was zudem die deutlich eingeschränkte Aussagekraft dieses Markers vor Augen führt. Da sich keine eindeutige Tendenz beobachten lässt, lässt sich dies ebenfalls nur damit kommentieren, dass weitere Studien an einem größeren Patientenkollektiv und eventuell über einen längeren Zeitraum notwendig sind.

#### 5.4 Kritische Betrachtung methodischer Aspekte der eigenen Untersuchung und Verbesserungsmöglichkeiten

Zunächst ist anzumerken, dass unsere Studie an einer vergleichsweise kleinen Gruppe von CRSwNP-Patienten durchgeführt wurde, was sich zum einen aufgrund des hohen experimentellen Aufwands der zytologischen Färbungen und der anschließenden Auswertung und zum anderen aufgrund der geringen Zahl an CRSwNP-Patienten die sich für eine Dupilumab-Therapie qualifizieren per se erklären lässt. Zudem sollte den an der HNO-Klinik des UKS behandelten Patienten mit therapierefraktärer CRSwNP auch eine Behandlung mit den beiden anderen zugelassenen Biologika Omalizumab und Mepolizumab angeboten werden, was die Möglichkeiten der Patientenrekrutierung weiter eingeschränkt hat. Um bessere Aussagen über die Sensitivität und Spezifität der Methode machen zu können, muss die Studie an einem größeren Patientenkollektiv und gegebenenfalls über einen längeren Zeitraum als ein Jahr durchgeführt werden, auch wenn die Ergebnisse bzgl. der von uns formulierten Hauptfragestellungen bereits an dem vergleichsweise kleinen Patientenkollektiv von  $n=20$  Patienten schon statistisch sehr deutlich sind.

Daneben müssen potentielle Confounder in der Datenanalyse durch individuelle Lebensgewohnheiten als Fehlerquellen berücksichtigt werden. Faktoren wie zum Beispiel Nikotinkonsum, das soziale Lebensumfeld, Essgewohnheiten, Stoffwechselkrankheiten und Risikofaktorexpositionen können zu einer Verzerrung der statistischen Datenanalyse sowohl hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung der Nasenschleimhaut wie auch der von den Patienten berichteten Lebensqualität und damit auch der Schlussfolgerung der Studie führen (CHEN et al., 2003). So beschreiben sowohl Hirsch et al. als auch Reh et al. einen Zusammenhang zwischen Nikotinkonsum und der CRS (HIRSCH et al., 2017; REH et al., 2012). Es ist bekannt, dass ein Tabakkonsum erhebliche Asuwirkungen auf die Nasenschleimhaut und die mukoziliäre Clearance ausübt (PAGLIUCA et al., 2015). Pagliuca et al. beobachteten beispielweise eine reduzierte Anzahl an Flimmerzellen in der Nasenschleimhaut von Rauchern (PAGLIUCA et al., 2015). Es wurden außerdem erhöhte Konzentrationen von nasalem Stickstoffmonoxid (NO) bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern festgestellt. NO wiederum bewirkt eine vermehrte Schleimproduktion der Becherzellen und Schleimhautstörungen (ZHOU et al., 2011). Auch Sridhar et al. stellten einen Nachweis von Zell- und Rezeptorschäden durch Zigarettenrauch fest (SRIDHAR et al., 2008). Andere Irritantien wie Staubbelastung im Lebensumfeld, Luftverschmutzung, kalte Luft oder auch bestimmte Antigene, haben ebenfalls einen Einfluss auf die nasale Schleimhaut und spielen aus diesem Grund auch eine Rolle, wenn es um die Analyse dieser geht (BASCOM, 1991). Um solche Confounder identifizieren zu können, wäre es von Vorteil, weitere Faktoren in der Studie zu berücksichtigen. Man könnte die Studienteilnehmer beispielweise bitten, ein Studientagebuch zu führen, in dem sie bestimmte Ereignisse (z.B. Erkältungen, Medikamenteneinnahmen etc.) notieren, um so zusätzliche Informationen über den Patienten sammeln zu können. So könnte man zusätzliche Subgruppen definieren und entsprechende Subgruppenanalysen durchführen, um den Einfluss dieser potentiellen Confounder erfassen zu können. Hierfür fehlt allerdings im Rahmen der hier vorgestellten Studie sowohl die anamnestische Datengrundlage als auch der zur Subgruppenbildung erforderliche deutlich größere Umfang der Stichprobe.

Weiterhin ist anzumerken, dass die Auswertung der Nasenabstriche immer im Kontext des Patienten zu betrachten ist. In vereinzelt Fällen waren beispielweise Patienten bei Ihrem Sprechstundenbesuch erkältet. Um den Patienten keinem zusätzlichen Aufwand auszusetzen, führten wir die Nasenabstriche dennoch jeweils an ihren ambulanten Kontrollterminen durch unabhängig davon, ob sie erkältet oder gesund waren. Dieser Zustand beeinflusst allerdings die Ergebnisse der Nasenabstriche. In Studien anderer Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden,

dass bei einem Infekt entzündliche Zellinfiltrate aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Lymphozyten vermehrt in nasalen Abstrichpräparaten zu finden waren und dadurch das prozentuale Ergebnis verfälscht werden kann. Dem zufolge sollten auch Faktoren wie Symptome und die Krankheitsgeschichte bei der Studienvisite erfasst werden (GELARDI et al., 2016). Ein Verbesserungsvorschlag wäre zudem, die Patienten darauf aufmerksam zu machen, dass sie bei einem Infekt einen zeitnahen Ausweichtermin vereinbaren können, was allerdings auf Kosten der Einheitlichkeit der Zeiträume zwischen den einzelnen Studienvisiten gehen würde und damit andere potentielle Verzerrungsquellen generieren würde.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die morphologische Beurteilung eines Nasenabstrich stark abhängig vom jeweiligen Untersucher und dessen Erfahrung ist (GELARDI et al., 2016). Dies ist vor allem wichtig, wenn man die Anzahl der Zellen im zeitlichen Verlauf auswerten möchte. Deshalb ist es nötig, dass die Auswertung stets einheitlich und standardisiert unter dem gleichen Schema und am besten von der gleichen Person durchgeführt wird. Außerdem ist geeignetes Fachpersonal mit langjähriger Erfahrung in der Zytologie von großem Vorteil, da die morphologische Beurteilung nasaler Abstriche einen gewissen Einarbeitungsprozess mit entsprechender Lernkurve erfordert und in den meisten Fällen anspruchsvoller ist als die Auswertung immunhistochemischer Färbungen. Dies könnte die potenziell routinemäßige Anwendung in der klinischen Praxis niedergelassener Ärzte einschränken. Derzeit dürften die wenigsten niedergelassenen wie auch klinisch tätigen Pathologen in der Bewertung nasaler Abstrichzytologie geschult und trainiert sein, so dass hier erst ein entsprechender Ausbildungsprozess erforderlich wäre.

Daneben muss angemerkt werden, dass sich die Präparate in einigen Fällen in der zellulären Zusammensetzung und dem Schleimgehalt deutlich unterscheiden, was sowohl Patienten- als auch Erkrankungsspezifische Ursachen haben kann. Diese Heterogenität schränkte die Genauigkeit der Auswertung in bestimmten Fällen ein. Umso wichtiger ist ein einheitliches Protokoll in der zytomorphologischen Auswertung, um den qualitativen Unterschied der Präparate möglichst wenig Einfluss auf das Auswertungsergebnis nehmen zu lassen. Hierbei kann es hilfreich sein, darauf zu achten, dass die Patienten vor dem Nasenabstrich die Nase säubern, damit weniger Schleim auf den Präparaten zu finden ist. Trotz dieser Maßnahmen konnten einige Präparate schwieriger ausgewertet werden als andere. Nicht unberücksichtigt bleiben darf auch die subjektive Auswahl der einzelnen Gesichtsfelder (20 pro Präparat) durch den Untersucher, die Grundlage der zytomorphologischen Auswertung sind. Auch wenn der Untersucher in unserer Studie bzgl. der klinischen Daten des Patienten und auch dem Zeitpunkt der Studienvisite (SV1-

5) verblindet war und damit ein Rosenthal-Effekt großteils ausgeschlossen werden kann, bleibt die Auswahl der Gesichtsfelder eine potentielle Fehlerquelle, die zu Verzerrungen in der Auswertung führen kann.

Hinzu kommt, dass saisonale Veränderungen im Rahmen unserer Arbeit nicht berücksichtigt wurden, diese aber durchaus in der Literatur in der nasalen Abstrichzytologie beschrieben wurden (CANAKCIOGLU et al., 2009; GELARDI et al., 2014). Ein möglicher Ansatz um diese potentielle Fehlerquelle zumindest besser bei der Auswertung berücksichtigen zu können, wäre es, gesunde Kontrollpatienten ebenfalls abzustreichen, um saisonale und physiologische Veränderungen in der Zellzahl zu identifizieren.

Darüber hinaus ist die Nasenschleimhaut in ständigem Kontakt mit der Umwelt und so können Noxen Veränderungen in der Schleimhaut verursachen, die nicht direkt mit dem Krankheitsbild der CRSwNP bzw. deren medikamentöser Therapie in Verbindung stehen und die nasalen Abstriche somit verfälschen (CANAKCIOGLU et al., 2009). Auch darauf könnte im Rahmen von Studien-Tagebüchern geachtet werden.

Im Rahmen unserer Studie wurde in erster Linie Polypengewebe abgestrichen und bei fehlenden Polypen die untere Nasenmuschel, was auch in der Mehrzahl der bisher zur nasalen Abstrichzytologie veröffentlichten Studien analog durchgeführt wurde (GELARDI et al., 2016). In ihren Studien beschreiben jedoch beispielsweise Boccioloni et al. und Gallo et al., dass die mittlere Nasenmuschel besser im Hinblick auf eine valide zytologische Auswertung geeignet ist (BOCCIOLINI et al., 2022; GALLO et al., 2020). Gallo et al. veröffentlichten 2020 erstmals die Studie, in der die mittlere Nasenmuschel untersucht wurde. An einer kleinen Patientengruppe von 33 Patienten stellten sie fest, dass die mittlere im Gegensatz zur unteren Nasenmuschel besser geeignet ist, um Gewebeseosinophilie nachzuweisen (GALLO et al., 2020). Darauf aufbauend, untersuchten Bocciolini et al. ebenfalls die mittlere Nasenmuschel an 107 Patienten und beobachteten ebenfalls eine Überlegenheit der mittleren Nasenmuschel bezüglich der Analyse von entzündlichem Gewebe (BOCCIOLINI et al., 2022). Da dies ein neuer Ansatz ist, der zum Zeitpunkt des Starts unserer Studie noch nicht veröffentlicht wurde, orientierten wir uns an der konventionellen Methode. Außerdem existierten mehr Forschungen an der unteren Nasenmuschel und diese Methode ist allgemein anerkannt, was uns in unserer Entscheidung bekräftigte. Die untere Nasenmuschel bietet auch den Vorteil, dass dort das Flimmerzellen/Becherzellen-Verhältnis am ehesten ausgeglichen ist und aus diesem Grund nur geringe Verfälschungen zu erwarten sind (GELARDI et al., 2016). Bezüglich der mittleren Nasenmuschel sind noch weitere Studien nötig, um dieses Verfahren zu etablieren. Zweifelsohne spielt es eine

entscheidende Rolle, wo man abstreicht, da die Nasenschleimhaut sich in seiner Zusammensetzung je nach Lokalisation unterscheidet (DEPREZ et al., 2020). Wichtig ist es deshalb vor allem darauf zu achten, bei jeder Studienvisite die gleiche Lokalisation abzustreichen.

In unserer Auswertung wurden pro Präparat 20 Blickfelder in einer 60-fachen Vergrößerung ausgewertet. Andere Autoren haben in ihren Arbeiten z.B. bei 1000-facher-Vergrößerung jeweils 50 Gesichtsfelder ausgewertet (CARUSO et al., 2022). Auch hier lassen sich Argumente für beide Auswertemethoden finden: Eine höhere Vergrößerung erlaubt eine vereinfachte Auswertung. Die damit einhergehende Erhöhung der Anzahl der Gesichtsfelder versucht die dabei entstehende Verzerrung zu minimieren, die bei einer solchen Vergrößerung entsteht. Allerdings ist diese Vergrößerung mit einer vermehrten Arbeit verbunden, da nicht nur mehr Gesichtsfelder fotografiert werden müssen, sondern auch ausgewertet werden müssen. Fünfzig Gesichtsfelder pro Präparat sind für den Befundenden Kollegen definitiv mit mehr Aufwand verbunden als 20 Gesichtsfelder pro Präparat. Eine weitere Option wäre es gewesen, bei 10-facher Vergrößerung 10 Gesichtsfelder auszuwerten. Allerdings stellte sich dabei die Auswertung der einzelnen Zellen als zu schwierig dar. Um ein annähernd repräsentatives Ergebnis gewährleisten zu können entschieden wir uns aus diesem Grund für eine 60-fache Vergrößerung und werteten 20 Gesichtsfelder pro Präparat aus.

## 5.5 Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der aktuellen Literatur

Um die nasale Abstrichzytologie in der klinischen Praxis einführen zu können, bedarf es weiterer Forschungen, beispielweise an einem größeren Patientenkollektiv. Um das Verfahren in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde realisieren zu können, bedarf es eines einheitlichen Standards zur zytologischen Beurteilung von Nasenabstrichen im Zusammenhang mit der individuellen Krankengeschichte. Erste Ansätze einer Empfehlung geben Heffler et al. in ihrem 2018 veröffentlichten Paper, in dem sie einige Beispielfälle mit dazugehörigen Auswertungsempfehlungen von MGG-Präparaten zeigen (HEFFLER et al., 2018). Außerdem ist eine flächendeckende Schaffung der notwendigen Infrastrukturen nötig.

In Zukunft wird es wahrscheinlich auch Gegenstand weiterer Forschung sein, ein computergestütztes System zu entwickeln, welches die Präparate objektiv und automatisch auswerten kann. In unserer Arbeitsgruppe wird derzeit ähnliches in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Informatik der Hochschule Trier bezüglich der Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen untersucht. In der Gynäkologie ist ein solches System namens Bethesda zur Beurteilung dysplasti-

scher Läsionen der Zervix bereits etabliert (NAYAR, WILBUR, 2015). Da wir große Fortschritte in der Entwicklung der künstlichen Intelligenz im Kontext biomedizinischer Fragestellungen sehen, scheint die Möglichkeit der Übertragung derartiger Methoden auf die nasale Abstrichzytologie möglich. Erste Versuche, die nasale Zytologie maschinell auszuwerten, gibt es bereits, wie Dimauro et al. 2019 veröffentlichten (DIMAURO et al., 2019). Dabei nutzten sie die Technik des „deep learnings“ und die Software „Python“, um mikroskopische Bilder von nasalen Abstrichen automatisch zu analysieren. Es wurden 14 Präparate mit jeweils 50 Blickfeldern und 1000-facher Vergrößerung ausgewertet. Im ersten Schritt wurden die Zellen identifiziert (Sensitivität > 97%) und anschließend im zweiten Schritt klassifiziert (Sensitivität 99%) (DIMAURO et al., 2019). Dies ist ein großer Fortschritt in der nasalen Zytologie und kann damit die bisher semiquantitative Auswertung zu einer quantitativen Auswertung weiterentwickeln, welche wissenschaftlich gesehen präziser ist. Von Vorteil ist dies auch, da es zeitsparend ist und man nicht von qualifiziertem Fachpersonal abhängig ist, die dieser ermüdenden Tätigkeit ausgesetzt werden.

Die Suche nach Biomarkern der CRS wird auch in Zukunft weiterhin Teil der Forschung sein (BACHERT et al., 2020). Auch im diesjährigen Kongress der Deutschen Gesellschaft HNO (DGHNO 2022) wurden diesbezüglich einige Vorträge gehalten. So beschäftigte sich beispielsweise eine Forschungsgruppe in Erlangen mit der „Vorhersage von Phänotypen der chronischen Rhinosinusitis mittels nicht-invasiver Biomarker und Machine Learning“ und stellte dabei fest, dass anhand von Interleukin-5 und der Kombination aus vier Proteinmarkern (Periostin, CST-2, ECP und PAPP-A) im Nasensekret die beiden Phänotypen CRSwNP und CRSsNP unterschieden werden können (MÜLLER et al., 2022).

Da es immer wichtiger wird, Biomarker in der Diagnostik und Therapie der CRSwNP zu finden, stellten Bachert et al. im diesjährigen Kongress der DGHNO ein Poster aus, in dem sie die „Prävalenz von Typ-2-inflammatorischen Signaturen in Patienten mit chronischer Rhinosinusitis mit Nasenpolypen aus zwei Phase 3 klinischen Studien, SINUS-24 und SINUS-52“ zusammenfassten. Dabei stellte sich heraus, dass 95 % der Studienteilnehmer eine Typ-2-Inflammation aufwiesen (BACHERT et al., 2022).

Auch weitere Arbeitsgruppen beschäftigen sich derzeit mit der Suche nach nasalen Biomarkern unter Dupilumab-Therapie, um den Therapieeffekt vorhersagen zu können. So beispielsweise auch eine Arbeitsgruppe in Münster, die anhand von nasalem Sekret IL-15, IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, INF $\gamma$ , IL-18 und TLSP quantifiziert, bisher jedoch kein signifikantes Ergebnis feststellen konnte (ABBASPOUR et al., 2022).

Obwohl die nasale Abstrichzytologie die bereits genannten Vorteile bietet und damit großes Potential in der Diagnostik und Nachsorge der CRSwNP hat, wird sie in der klinischen Praxis kaum angewendet und findet auch in den bisherigen Leitlinien keine Berücksichtigung (STUCK et al., 2018). Als nicht-invasive Methode, ist sie zur wiederholten und regelmäßigen Überprüfung der Therapie möglich. Als risikoarmes und schmerzfreies Verfahren können somit auch frühzeitig Veränderungen der Schleimhaut beobachtet werden. Es ist auch möglich, mehrere Abstriche pro Patienten an einem Tag durchzuführen. Um den Aufwand für unsere Studienteilnehmer möglichst gering zu halten, führten wir pro Studienbesuch allerdings nur einen Nasenabstrich durch und führten eine Zweitfärbung der Präparate durch. Dabei zeigten wie bereits erwähnt 80% der Zweitfärbung ein gutes Ergebnis.

## 5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel der vorgestellten Arbeit war es, mit der Technik der Abstrichzytologie die zelluläre Zusammensetzung der Nasenschleimhaut bei Patienten mit einer CRSwNP zu untersuchen, die eine systemische Therapie mit dem Antikörper Dupilumab erhalten. Die erste Analyse einer repräsentativen Gruppe von 20 CRSwNP-Patienten ergab eine signifikante Abnahme der im Abstrich detektierten eosinophilen Zellzahl im zeitlichen Verlauf unter Dupilumab-Therapie sowohl in der MGG- als auch in der ICC-Färbung. Durch die Korrelation der nasalen Differentialzytologie mit dem Therapieansprechen der Patienten versuchten wir diese Ergebnisse zu unterstreichen und die diagnostische Wertigkeit der Abstrichzytologie als prädiktiven Marker für ein Ansprechen auf eine Dupilumab-Therapie zu evaluieren. Leider zeigte sich dabei noch kein signifikantes Ergebnis. Um die nasale Abstrichzytologie als nicht-invasiven Test zum Therapiemonitoring bei dieser Therapieform etablieren zu können, sind demnach weitere klinische und experimentelle Forschungsansätze sowie eine umfassende multivariante Datenanalyse mit einem größeren Patientenkollektiv nötig. Die nasale Abstrichzytologie bietet durch ihre günstige und nicht-invasive Methode viele Vorteile, um im Rahmen einer ambulanten Vorstellung der Patienten und ohne die Notwendigkeit einer Narkose, potentiell Aussagen über das Therapieansprechen und den Therapieverlauf geben zu können. Trotz der Erkenntnisse und dem nachgewiesenen, potentiellen klinischen Nutzen findet die nasale Abstrichzytologie aktuell keine routinemäßige Anwendung in der klinischen Praxis und nur wenige Arbeitsgruppen weltweit beschäftigen sich wissenschaftlich mit der Weiterentwicklung dieser Technik und einer



Ausweitung des Anwendungsspektrums. Außerdem existieren nach aktuellem Stand keine einheitlichen Methoden, um eine zielgerichtete und effektive Patientenselektion der Dupilumab-Therapie zu gewährleisten. Zusätzliche Kriterien bzw. Marker sind erforderlich, um die wirklich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von dieser Therapie profitierenden Patienten auszuwählen. Es ist entscheidend, weitere Ansätze für eine zielgerichtete Therapie zu finden und die richtigen Patienten für diese Therapieansätze auf der Basis eines molekularen, prädiktiven Markerpanels auszuwählen, auch angesichts der enorm hohen Kosten der Dupilumab-Therapie (20 000 Euro pro Patient und Jahr). Unser Ansatz, die Eosinophilie in der nasalen Abstrichzytologie als Biomarker zu nutzen und mit der Abnahme der Eosinophilenzellzahl sowohl in der MGG- als auch in der ICC-Auswertung den Therapieerfolg mit Dupilumab zu verfolgen, stellt erste Ansätze in dieser Hinsicht dar. Die Abnahme der Eosinophilen-Konzentration in der nasalen Abstrichzytologie hat ein hohes Potential, als nicht-invasiver Biomarker für ein Therapieansprechen unter Dupilumab-Therapie bei CRSwNP-Patienten genutzt zu werden. Um diesen potentiellen Nutzen weiter zu erhärten und statistisch besser belegen zu können, sind zweifelsohne weitere Studien unter Verwendung dieser Technik an deutlich größeren Patientenkollektiven erforderlich.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abbaspour B, Nierkamp I, Stübke K, Riders A, Oberste M, Beule GA, Rudack C (2022) Therapieeffekt und nasale Biomarkerexpression unter Dupilumab bei der schweren chronischen Rhinosinusitis mit Polyposis (CRSwNP): Ergebnisse nach 3 Monaten Therapie. *Laryngo-Rhino-Otologie* 101:153-154
2. AeDA ÄDAeV (2019) Therapieinformationsblatt: Behandlung der chronischen Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (Polyposis nasi) mit Dupilumab/Dupilixent. Sanofi Genzyme
3. Agarwal A, Spath D, Sherris DA, Kita H, Ponikau JU (2020) Therapeutic Antibodies for Nasal Polyposis Treatment: Where Are We Headed? *Clin Rev Allergy Immunol* 59:141-149
4. Akdis CA, Bachert C, Cingi C, Dykewicz MS, Hellings PW, Naclerio RM, Schleimer RP, Ledford D (2013) Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: a PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 131:1479-1490
5. Alobid I, Benitez P, Cardelus S, de Borja Callejas F, Lehrer-Coriat E, Pujols L, Picado C, Mullol J (2014) Oral plus nasal corticosteroids improve smell, nasal congestion, and inflammation in sino-nasal polyposis. *Laryngoscope* 124:50-56
6. Bachert C, Pawankar R, Zhang L, Bunnag C, Fokkens WJ, Hamilos DL, Jirapongsananuruk O, Kern R, Meltzer EO, Mullol J, Naclerio R, Pilan R, Rhee CS, Suzuki H, Voegels R, Blaiss M (2014) ICON: chronic rhinosinusitis. *World Allergy Organ J* 7:25
7. Bachert C, Mannent L, Naclerio RM, Mullol J, Ferguson BJ, Gevaert P, Hellings P, Jiao L, Wang L, Evans RR, Pirozzi G, Graham NM, Swanson B, Hamilton JD, Radin A, Gandhi NA, Stahl N, Yancopoulos GD, Sutherland ER (2016) Effect of Subcutaneous Dupilumab on Nasal Polyp Burden in Patients With Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 315:469-479
8. Bachert C, Sousa AR, Lund VJ, Scadding GK, Gevaert P, Nasser S, Durham SR, Cornet ME, Kariyawasam HH, Gilbert J, Austin D, Maxwell AC, Marshall RP, Fokkens WJ

- (2017) Reduced need for surgery in severe nasal polyposis with mepolizumab: Randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 140:1024-1031 e1014
9. Bachert C, Han JK, Desrosiers M, Hellings PW, Amin N, Lee SE, Mullol J, Greos LS, Bosso JV, Laidlaw TM, Cervin AU, Maspero JF, Hopkins C, Olze H, Canonica GW, Paggiaro P, Cho SH, Fokkens WJ, Fujieda S, Zhang M, Lu X, Fan C, Draikiwicz S, Kamat SA, Khan A, Pirozzi G, Patel N, Graham NMH, Ruddy M, Staudinger H, Weinreich D, Stahl N, Yancopoulos GD, Mannent LP (2019) Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials. *Lancet* 394:1638-1650
  10. Bachert C, Zhang N, Cavaliere C, Weiping W, Gevaert E, Krysko O (2020) Biologics for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 145:725-739
  11. Bachert C, Han JK, Wagenmann M, Hosemann W, Lee SE, Backer V, Mullol J, Gevaert P, Klimek L, Prokopakis E, Knill A, Cavaliere C, Hopkins C, Hellings P (2021) EUFOREA expert board meeting on uncontrolled severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) and biologics: Definitions and management. *J Allergy Clin Immunol* 147:29-36
  12. Bachert C, Lee S, Hopkins C, Peters A, Fokkens W, Khan A, Praestgaard A, Siddiqui S, Nash S, Jacob-Nara J, Deniz Y, Rowe P (2022) The prevalence of type 2 inflammatory signatures in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps from two phase 3 clinical trials, SINUS-24 and SINUS-52. *Laryngo-Rhino-Otologie* 101:243-244
  13. Bascom R (1991) The upper respiratory tract: mucous membrane irritation. *Environ Health Perspect* 95:39-44
  14. Baumann I, Blumenstock G, DeMaddalena H, Piccirillo JF, Plinkert PK (2007) [Quality of life in patients with chronic rhinosinusitis: validation of the Sino-Nasal Outcome Test-20 German Adapted Version]. *HNO* 55:42-47
  15. Baumann I (2009) [Validated instruments to measure quality of life in patients with chronic rhinosinusitis]. *HNO* 57:873-881
  16. Bhattacharyya N, Villeneuve S, Joish VN, Amand C, Mannent L, Amin N, Rowe P, Maroni J, Eckert L, Yang T, Khan A (2019) Cost burden and resource utilization in patients with chronic rhinosinusitis and nasal polyps. *Laryngoscope* 129:1969-1975

17. Blauvelt A, de Bruin-Weller M, Gooderham M, Cather JC, Weisman J, Pariser D, Simpson EL, Papp KA, Hong HC, Rubel D, Foley P, Prens E, Griffiths CEM, Etoh T, Pinto PH, Pujol RM, Szepietowski JC, Ettler K, Kemeny L, Zhu X, Akinlade B, Hultsch T, Mastey V, Gadkari A, Eckert L, Amin N, Graham NMH, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD, Shumel B (2017) Long-term management of moderate-to-severe atopic dermatitis with dupilumab and concomitant topical corticosteroids (LIBERTY AD CHRONOS): a 1-year, randomised, double-blinded, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 389:2287-2303
18. Bocciolini C, Nappi E, Giunta G, Paoletti G, Malvezzi L, Monti G, Macchi A, Amorosa L, Heffler E (2022) Middle meatus nasal cytology compared to inferior turbinate cytology in non allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*
19. Borish L, Cohen NA, Chupp G, Hopkins C, Wagenmann M, Sousa AR, Smith SG, Silver J, Yang S, Mayer B, Yancey SW, Chan RH, Fokkens W (2022) Evaluating enrollment and outcome criteria in trials of biologics for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Ann Allergy Asthma Immunol* 129:160-168
20. Bridges MA, Walker DC, Davidson AG (1991) Cystic fibrosis and control nasal epithelial cells harvested by a brushing procedure. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A:684-686
21. Brocklehurst P, Kujan O, O'Malley LA, Ogden G, Shepherd S, Glenny AM (2013) Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev*:CD004150
22. Bundesausschuss G (2019) Dossier zur Nutzenbewertung gemäß §35a SGB V, Dupilumab.
23. Busse W, Corren J, Lanier BQ, McAlary M, Fowler-Taylor A, Cioppa GD, van As A, Gupta N (2001) Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108:184-190
24. Canakcioglu S, Tahamiler R, Saritzali G, Alimoglu Y, Isildak H, Guvenc MG, Acar GO, Inci E (2009) Evaluation of nasal cytology in subjects with chronic rhinitis: a 7-year study. *Am J Otolaryngol* 30:312-317
25. Caruso C, Giancaspro R, Guida G, Macchi A, Landi M, Heffler E, Gelardi M (2022) Nasal Cytology: A Easy Diagnostic Tool in Precision Medicine for Inflammation in

- Epithelial Barrier Damage in the Nose. A Perspective Mini Review. *Front Allergy* 3:768408
26. Cassini A, Hogberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, Colomb-Cotinat M, Kretzschmar ME, Devleesschauwer B, Cecchini M, Ouakrim DA, Oliveira TC, Struelens MJ, Suetens C, Monnet DL, Burden of AMRCG (2019) Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 19:56-66
  27. Castro M, Corren J, Pavord ID, Maspero J, Wenzel S, Rabe KF, Busse WW, Ford L, Sher L, FitzGerald JM, Katelaris C, Tohda Y, Zhang B, Staudinger H, Pirozzi G, Amin N, Ruddy M, Akinlade B, Khan A, Chao J, Martincova R, Graham NMH, Hamilton JD, Swanson BN, Stahl N, Yancopoulos GD, Teper A (2018) Dupilumab Efficacy and Safety in Moderate-to-Severe Uncontrolled Asthma. *N Engl J Med* 378:2486-2496
  28. Chaaban MR, Walsh EM, Woodworth BA (2013) Epidemiology and differential diagnosis of nasal polyps. *Am J Rhinol Allergy* 27:473-478
  29. Chen S, Zhou A, Emmanuel B, Garcia D, Rosta E (2020) Systematic literature review of humanistic and economic burdens of chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Curr Med Res Opin* 36:1913-1926
  30. Chen Y, Dales R, Lin M (2003) The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. *Laryngoscope* 113:1199-1205
  31. Chung JH, Lee YJ, Kang TW, Kim KR, Jang DP, Kim IY, Cho SH (2015) Altered Quality of Life and Psychological Health (SCL-90-R) in Patients With Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 124:663-670
  32. Ciofalo A, Cavaliere C, Incorvaia C, Plath M, Ridolo E, Pucciarini F, Altissimi G, Greco A, de Vincentiis M, Masieri S (2022) Diagnostic performance of nasal cytology. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 279:2451-2455
  33. De Greve G, Hellings PW, Fokkens WJ, Pugin B, Steelant B, Seys SF (2017) Endotype-driven treatment in chronic upper airway diseases. *Clin Transl Allergy* 7:22
  34. DeConde AS, Mace JC, Levy JM, Rudmik L, Alt JA, Smith TL (2017) Prevalence of polyp recurrence after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Laryngoscope* 127:550-555

35. Deprez M, Zaragosi LE, Truchi M, Becavin C, Ruiz Garcia S, Arguel MJ, Plaisant M, Magnone V, Lebrigand K, Abelanet S, Brau F, Paquet A, Pe'er D, Marquette CH, Leroy S, Barbry P (2020) A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 202:1636-1645
36. Dimauro G, Ciprandi G, Deperte F, Girardi F, Ladisa E, Latrofa S, Gelardi M (2019) Nasal cytology with deep learning techniques. *Int J Med Inform* 122:13-19
37. Ferrara L, Naviglio D, Armone Caruso A (2012) Cytological aspects on the effects of a nasal spray consisting of standardized extract of citrus lemon and essential oils in allergic rhinopathy. *ISRN Pharm* 2012:404606
38. Fokkens W, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, Toppila-Salmi S, Spretkelsen MB-, Mullol J (2020) Executive Summary of EPOS 2020 including integrated care pathways.82-111
39. Fokkens WJ, Lund V, Bachert C, Mullol J, Bjermer L, Bousquet J, Canonica GW, Deneyer L, Desrosiers M, Diamant Z, Han J, Heffler E, Hopkins C, Jankowski R, Joos G, Knill A, Lee J, Lee SE, Marien G, Pugin B, Senior B, Seys SF, Hellings PW (2019) EUFOREA consensus on biologics for CRSwNP with or without asthma. *Allergy* 74:2312-2319
40. Fulkerson PC, Rothenberg ME (2013) Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 12:117-129
41. Gaines A (2013) Chapter 13: Olfactory disorders. *Am J Rhinol Allergy* 27 Suppl 1:S45-47
42. Gallo S, Bandi F, Preti A, Facco C, Ottini G, Di Candia F, Mozzanica F, Saderi L, Sessa F, Reguzzoni M, Sotgiu G, Castelnovo P (2020) Exploring the role of nasal cytology in chronic rhinosinusitis. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 40:368-376
43. Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD (2016) Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. *Nat Rev Drug Discov* 15:35-50
44. Garratt A, Schmidt L, Mackintosh A, Fitzpatrick R (2002) Quality of life measurement: bibliographic study of patient assessed health outcome measures. *BMJ* 324:1417
45. Gelardi M, Fiorella ML, Leo G, Incorvaia C (2007) Cytology in the diagnosis of rhinosinusitis. *Pediatr Allergy Immunol* 18 Suppl 18:50-52

46. Gelardi M, Peroni DG, Incorvaia C, Quaranta N, De Luca C, Barberi S, Dell'albani I, Landi M, Frati F, de Beaumont O (2014) Seasonal changes in nasal cytology in mite-allergic patients. *J Inflamm Res* 7:39-44
47. Gelardi M, Iannuzzi L, Quaranta N, Landi M, Passalacqua G (2016) NASAL cytology: practical aspects and clinical relevance. *Clin Exp Allergy* 46:785-792
48. Gelardi M, Iannuzzi L, De Giosa M, Taliente S, De Candia N, Quaranta N, De Corso E, Seccia V, Ciprandi G (2017) Non-surgical management of chronic rhinosinusitis with nasal polyps based on clinical-cytological grading: a precision medicine-based approach. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 37:38-45
49. Gelardi M, Cavaliere C, Jannuzzi L (2018a) Nasal cytology. *J Biol Regul Homeost Agents* 32:37-40
50. Gelardi M, Landi M, Ciprandi G (2018b) Nasal cytology: a Precision Medicine tool in clinical practice. *Clin Exp Allergy* 48:96-97
51. Gelardi M, Ciprandi G, Cassano M (2021) Nasal cytology detects biofilms. *Med Pharm Rep* 94:267-268
52. Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, Van Steen K, Van Zele T, Acke F, De Ruyck N, Blomme K, Sousa AR, Marshall RP, Bachert C (2011) Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 128:989-995 e981-988
53. Gevaert P, Omachi TA, Corren J, Mullol J, Han J, Lee SE, Kaufman D, Ligueros-Saylan M, Howard M, Zhu R, Owen R, Wong K, Islam L, Bachert C (2020) Efficacy and safety of omalizumab in nasal polyposis: 2 randomized phase 3 trials. *J Allergy Clin Immunol* 146:595-605
54. Gibb RK, Martens MG (2011) The impact of liquid-based cytology in decreasing the incidence of cervical cancer. *Rev Obstet Gynecol* 4:S2-S11
55. Gliklich RE, Metson R (1995) The health impact of chronic sinusitis in patients seeking otolaryngologic care. *Otolaryngol Head Neck Surg* 113:104-109
56. Han JK, Bachert C, Fokkens W, Desrosiers M, Wagenmann M, Lee SE, Smith SG, Martin N, Mayer B, Yancey SW, Sousa AR, Chan R, Hopkins C, investigators Ss (2021) Mepolizumab for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (SYNAPSE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Respir Med* 9:1141-1153

57. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, Bousquet PJ, Brozek G, Bruno A, Dahlen SE, Forsberg B, Gunnbjornsdottir M, Kasper L, Kramer U, Kowalski ML, Lange B, Lundback B, Salagean E, Todo-Bom A, Tomassen P, Toskala E, van Drunen CM, Bousquet J, Zuberbier T, Jarvis D, Burney P (2011) Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA(2)LEN study. *Allergy* 66:1216-1223
58. Hedman J, Kaprio J, Poussa T, Nieminen MM (1999) Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *Int J Epidemiol* 28:717-722
59. Heffler E, Landi M, Caruso C, Fichera S, Gani F, Guida G, Liuzzo MT, Pistorio MP, Pizzimenti S, Riccio AM, Seccia V, Ferrando M, Malvezzi L, Passalacqua G, Gelardi M (2018) Nasal cytology: Methodology with application to clinical practice and research. *Clin Exp Allergy* 48:1092-1106
60. Heidemann M, Böske R, Thalau M, Jeschke S, Bruchhage K-L (2022) Dupilumab-Behandlung unkontrollierter CRSwNP: Real-Life 15-Monats-Daten. *Laryngo-Rhino-Otologie* 101:157-158
61. Hellings PW, Fokkens WJ, Akdis C, Bachert C, Cingi C, Dietz de Loos D, Gevaert P, Hox V, Kalogjera L, Lund V, Mullol J, Papadopoulos NG, Passalacqua G, Rondon C, Scadding G, Timmermans M, Toskala E, Zhang N, Bousquet J (2013) Uncontrolled allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: where do we stand today? *Allergy* 68:1-7
62. Hellings PW (2022) SWOT Analysis of Chronic Rhinosinusitis Care Anno 2022. *J Allergy Clin Immunol Pract* 10:1468-1471
63. Hellings PW, Peters AT, Chaker AM, Heffler E, Zhang H, Praestgaard A, Nash S, Khan AH, Siddiqui S, Jacob-Nara JA, Rowe PJ, Deniz Y (2022) Rapid and sustained effects of dupilumab in severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int Forum Allergy Rhinol* 12:958-962
64. HH K, LK J, SB G (2020) Dupilumab: Clinical Efficacy of Blocking IL-4/IL-13 Signalling in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Drug Des Devel Ther*
65. HiMedia GranuloSep™ GSM 1119, Product Information 6



66. Hirsch AG, Stewart WF, Sundaresan AS, Young AJ, Kennedy TL, Scott Greene J, Feng W, Tan BK, Schleimer RP, Kern RC, Lidder A, Schwartz BS (2017) Nasal and sinus symptoms and chronic rhinosinusitis in a population-based sample. *Allergy* 72:274-281
67. Ho J, Bailey M, Zaunders J, Mrad N, Sacks R, Sewell W, Harvey RJ (2015) Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) are increased in chronic rhinosinusitis with nasal polyps or eosinophilia. *Clin Exp Allergy* 45:394-403
68. Hoffmann SA, Jansen F, Becker B, Breda P, Hot A, Burandt E-C, Betz C (2022) Real world data zur Effektivität und Sicherheit von Dupilumab bei erwachsenen Patienten mit unkontrollierter schwerer chronischer Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (CRSwNP). *Laryngo-Rhino-Otologie* 101:154-154
69. Hopkins C, Gillett S, Slack R, Lund VJ, Browne JP (2009) Psychometric validity of the 22-item Sinonasal Outcome Test. *Clin Otolaryngol* 34:447-454
70. Hosemann W, Draf C (2013) Danger points, complications and medico-legal aspects in endoscopic sinus surgery. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 12:Doc06
71. Hox V, Lourijzen E, Jordens A, Aasbjerg K, Agache I, Alobid I, Bachert C, Boussery K, Campo P, Fokkens W, Hellings P, Hopkins C, Klimek L, Makela M, Mosges R, Mullol J, Pujols L, Rondon C, Rudenko M, Toppila-Salmi S, Scadding G, Scheire S, Tomazic PV, Van Zele T, Wagemann M, van Boven JFM, Gevaert P (2020) Benefits and harm of systemic steroids for short- and long-term use in rhinitis and rhinosinusitis: an EAACI position paper. *Clin Transl Allergy* 10:1
72. Ikeda K, Shiozawa A, Ono N, Kusunoki T, Hirotsu M, Homma H, Saitoh T, Murata J (2013) Subclassification of chronic rhinosinusitis with nasal polyp based on eosinophil and neutrophil. *Laryngoscope* 123:E1-9
73. J.Bock (2018) Relation zwischen den subjektiv von Mukoviszidose-Patienten geschilderten sinunasalen Symptomen und den objektiv gemessenen Ergebnissen der aktiven anterioren Rhinomanometrie sowie der Rhinoskopie
- .35
74. Jonstam K, Swanson BN, Mannent LP, Cardell LO, Tian N, Wang Y, Zhang D, Fan C, Holtappels G, Hamilton JD, Grabher A, Graham NMH, Pirozzi G, Bachert C (2019)

- Dupilumab reduces local type 2 pro-inflammatory biomarkers in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis. *Allergy* 74:743-752
75. Kato A (2015) Immunopathology of chronic rhinosinusitis. *Allergol Int* 64:121-130
76. Kern RC, Conley DB, Walsh W, Chandra R, Kato A, Tripathi-Peters A, Grammer LC, Schleimer RP (2008) Perspectives on the etiology of chronic rhinosinusitis: an immune barrier hypothesis. *Am J Rhinol* 22:549-559
77. Khan A, Huynh TMT, Vandeplas G, Joish VN, Mannent LP, Tomassen P, van Zele T, Cardell LO, Arebro J, Olze H, Forster-Ruhrmann U, Kowalski ML, Olszewska-Ziaber A, Fokkens W, van Drunen C, Mullol J, Alobid I, Hellings PW, Hox V, Toskala E, Scadding G, Lund V, Bachert C (2019) The GALEN rhinosinusitis cohort: chronic rhinosinusitis with nasal polyps affects health-related quality of life. *Rhinology* 57:343-351
78. Kim C, Han J, Wu T, Bachert C, Fokkens W, Hellings P, Hopkins C, Lee S, Mullol J, Lee JT (2021) Role of Biologics in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyposis: State of the Art Review. *Otolaryngol Head Neck Surg* 164:57-66
79. Klimek L, Dollner R, Pfaar O, Mullol J (2014) Aspirin desensitization: useful treatment for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) in aspirin-exacerbated respiratory disease (AERD)? *Curr Allergy Asthma Rep* 14:441
80. Klimek L, Beule AG, Förster-Ruhrmann U, Becker S, Chaker A, Huppertz T, Hagemann J, Hoffmann TK, Dazert S, Deitmer T, Wrede H, Schlenter W, Welkoborsky HJ, Wollenberg B, Olze H, Rudack C, Sperl A, Casper I, Dietz A, Wagenmann M, Zuberbier T, Bergmann KC, Bedbrook A, Bousquet J, Bachert C (2020) Positionspapier: Hinweise zur Patienteninformation und -aufklärung vor Anwendung von Biologika bei chronischer Rhinosinusitis mit Polyposis nasi (CRSwNP). *Laryngo-Rhino-Otol*:761–769
81. Koennecke M, Klimek L, Mullol J, Gevaert P, Wollenberg B (2018) Subtyping of polyposis nasi: phenotypes, endotypes and comorbidities. *Allergo J Int* 27:56-65
82. Kohli P, Naik AN, Harruff EE, Nguyen SA, Schlosser RJ, Soler ZM (2017) The prevalence of olfactory dysfunction in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 127:309-320
83. Koski RR, Hill L, Taavola K (2022) Efficacy and Safety of Biologics for Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps. *J Pharm Technol* 38:289-296

84. Liao B, Liu JX, Li ZY, Zhen Z, Cao PP, Yao Y, Long XB, Wang H, Wang Y, Schleimer R, Liu Z (2018) Multidimensional endotypes of chronic rhinosinusitis and their association with treatment outcomes. *Allergy* 73:1459-1469
85. Loftus CA, Soler ZM, Koochakzadeh S, Desiato VM, Yoo F, Nguyen SA, Schlosser RJ (2020) Revision surgery rates in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: meta-analysis of risk factors. *Int Forum Allergy Rhinol* 10:199-207
86. Mangalesh S, Dudani S, Malik A (2022) The systemic immune-inflammation index in predicting sepsis mortality. *Postgrad Med*
87. Märker-Hermann E (2013) Systemische Inflammation. *Der Internist* 54:397-398
88. Meltzer EO, Hamilos DL, Hadley JA, Lanza DC, Marple BF, Nicklas RA, Adinoff AD, Bachert C, Borish L, Chinchilli VM, Danzig MR, Ferguson BJ, Fokkens WJ, Jenkins SG, Lund VJ, Mafee MF, Naclerio RM, Pawankar R, Ponikau JU, Schubert MS, Slavin RG, Stewart MG, Togias A, Wald ER, Winther B, Rhinosinusitis I (2006) Rhinosinusitis: developing guidance for clinical trials. *J Allergy Clin Immunol* 118:S17-61
89. Meltzer EO, Hamilos DL (2011) Rhinosinusitis diagnosis and management for the clinician: a synopsis of recent consensus guidelines. *Mayo Clin Proc* 86:427-443
90. Mendelsohn D, Jeremic G, Wright ED, Rotenberg BW (2011) Revision rates after endoscopic sinus surgery: a recurrence analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 120:162-166
91. Menzella F, Montanari G, Patricelli G, Cavazza A, Galeone C, Ruggiero P, Bagnasco D, Facciolongo N (2019) A case of chronic eosinophilic pneumonia in a patient treated with dupilumab. *Ther Clin Risk Manag* 15:869-875
92. Milonski J, Zielinska-Blizniewska H, Majsterek I, Przybylowska-Sygut K, Sitarek P, Korzycka-Zaborowska B, Olszewski J (2015) Expression of POSTN, IL-4, and IL-13 in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *DNA Cell Biol* 34:342-349
93. Mitroi M, Albulescu D, Capitanescu A, Docea AO, Musat G, Mitroi G, Zlatian O, Tsatsakis A, Tzanakakis G, Spandidos DA, Calina D (2019) Differences in the distribution of CD20, CD3, CD34 and CD45RO in nasal mucosa and polyps from patients with chronic rhinosinusitis. *Mol Med Rep* 19:2792-2800
94. Müller S, Becker M, Wendler O, Kist A, Bleier B, Iro H (2022) Vorhersage von Phänotypen der chronischen Rhinosinusitis mittels nicht-invasiver Biomarker und Machine Learning. *Laryngo-Rhino-Otologie* 101:158-158

95. Myszkowska D, Bazgier M, Bronska S, Nowak K, Ozga J, Wozniak A, Stanisz A, Szalaniec J (2022) Scraping nasal cytology in the diagnostics of rhinitis and the comorbidities. *Sci Rep* 12:14492
96. Nayar R, Wilbur DC (2015) The Pap Test and Bethesda 2014. "The reports of my demise have been greatly exaggerated." (after a quotation from Mark Twain). *Acta Cytol* 59:121-132
97. Orlandi RR, Kingdom TT, Smith TL, Bleier B, DeConde A, Luong AU, Poetker DM, Soler Z, Welch KC, Wise SK, Adappa N, Alt JA, Anselmo-Lima WT, Bachert C, Baroody FM, Batra PS, Bernal-Sprekelsen M, Beswick D, Bhattacharyya N, Chandra RK, Chang EH, Chiu A, Chowdhury N, Citardi MJ, Cohen NA, Conley DB, DelGaudio J, Desrosiers M, Douglas R, Eloy JA, Fokkens WJ, Gray ST, Gudis DA, Hamilos DL, Han JK, Harvey R, Hellings P, Holbrook EH, Hopkins C, Hwang P, Javer AR, Jiang RS, Kennedy D, Kern R, Laidlaw T, Lal D, Lane A, Lee HM, Lee JT, Levy JM, Lin SY, Lund V, McMains KC, Metson R, Mullol J, Naclerio R, Oakley G, Otori N, Palmer JN, Parikh SR, Passali D, Patel Z, Peters A, Philpott C, Psaltis AJ, Ramakrishnan VR, Ramanathan M, Jr., Roh HJ, Rudmik L, Sacks R, Schlosser RJ, Sedaghat AR, Senior BA, Sindwani R, Smith K, Snidvongs K, Stewart M, Suh JD, Tan BK, Turner JH, van Drunen CM, Voegels R, Wang Y, Woodworth BA, Wormald PJ, Wright ED, Yan C, Zhang L, Zhou B (2021) International consensus statement on allergy and rhinology: rhinosinusitis 2021. *Int Forum Allergy Rhinol* 11:213-739
98. Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, Humbert M, Katz LE, Keene ON, Yancey SW, Chanez P, Investigators M (2014) Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 371:1198-1207
99. Pagliuca G, Rosato C, Martellucci S, de Vincentiis M, Greco A, Fusconi M, De Virgilio A, Gallipoli C, Simonelli M, Gallo A (2015) Cytologic and functional alterations of nasal mucosa in smokers: temporary or permanent damage? *Otolaryngol Head Neck Surg* 152:740-745
100. Park DY, Kim S, Kim C-H, Yoon J-H, Kim H-J (2016) Alternative Method for Primary Nasal Epithelial Cell Culture Using Intranasal Brushing and Feasibility for the Study of Epithelial Functions in Allergic Rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 8:69-78
101. Penn R, Mikula S (2007) The role of anti-IgE immunoglobulin therapy in nasal polyposis: a pilot study. *Am J Rhinol* 21:428-432

102. Pfaar O, Gehrt F, Li H, Rudhart SA, Nastev A, Stuck BA, Hoch S (2021) Anti-IgE: A treatment option in allergic rhinitis? *Allergol Select* 5:119-127
103. Ramanathan M, Jr., Lee WK, Spannhake EW, Lane AP (2008) Th2 cytokines associated with chronic rhinosinusitis with polyps down-regulate the antimicrobial immune function of human sinonasal epithelial cells. *Am J Rhinol* 22:115-121
104. Rampi A, Vinciguerra A, Tanzini U, Bussi M, Trimarchi M (2022) Comparison of guidelines for prescription and follow-up of biologics for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Eur Arch Otorhinolaryngol*
105. Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ (2000) Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today* 6:20-27
106. Reh DD, Higgins TS, Smith TL (2012) Impact of tobacco smoke on chronic rhinosinusitis: a review of the literature. *Int Forum Allergy Rhinol* 2:362-369
107. Ren HL, Li JD, Yue FS, Sun JL, Rebeiz EE, Theoharides TC (2019) Nasal cytology with emphasis on mast cells can improve the diagnosis and treatment of chronic rhinosinusitis. *Chin Med J (Engl)* 132:2237-2241
108. Robinson D, Humbert M, Buhl R, Cruz AA, Inoue H, Korom S, Hanania NA, Nair P (2017) Revisiting Type 2-high and Type 2-low airway inflammation in asthma: current knowledge and therapeutic implications. *Clin Exp Allergy* 47:161-175
109. Rosati D, Rosato C, Pagliuca G, Cerbelli B, Della Rocca C, Di Cristofano C, Martellucci S, Gallo A (2020) Predictive markers of long-term recurrence in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Otolaryngol* 41:102286
110. Rosenfeld RM (2007) Clinical practice guideline on adult sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 137:365-377
111. Rudmik L, Soler ZM (2015) Medical Therapies for Adult Chronic Sinusitis: A Systematic Review. *JAMA* 314:926-939
112. Rutland J, Cole PJ (1980) Non-invasive sampling of nasal cilia for measurement of beat frequency and study of ultrastructure. *Lancet* 2:564-565
113. Rutland J, Dewar A, Cox T, Cole P (1982) Nasal brushing for the study of ciliary ultrastructure. *J Clin Pathol* 35:357-359

114. Sakmen KD, Leinung M, Diensthuber M, Weiß R, Krambeck A, Stöver T, Loth A (2022) CRSwNP und Dupilumab – Erfahrungen nach einem Jahr klinischer Anwendung an einer universitären HNO-Klinik. *Laryngo-Rhino-Otologie* 101:155-155
115. Sanofi (2022) Fachinformation 22
116. Schleimer RP, Berdnikovs S (2017) Etiology of epithelial barrier dysfunction in patients with type 2 inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 139:1752-1761
117. Settipane RA, Peters AT, Chiu AG (2013) Chapter 6: Nasal polyps. *Am J Rhinol Allergy* 27 Suppl 1:S20-25
118. Seuthe IMC, Kim J, Eichhorn S, Park JJ-H (2022) Auswirkung der Dupilumabtherapie bei Patienten mit schwerer chronischer polypöser Rhinosinusitis (CRSwNP) auf die Lebensqualität und Kontrolle der Komorbidität Asthma bronchiale. *Laryngo-Rhino-Otologie* 101:159-159
119. Shashy RG, Moore EJ, Weaver A (2004) Prevalence of the chronic sinusitis diagnosis in Olmsted County, Minnesota. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:320-323
120. Shirley M (2017) Dupilumab: First Global Approval. *Drugs* 77:1115-1121
121. Singhvi P, Baisakhiya N, Singh G (2019) Study the Role of Nasal Scrap Cytology in Allergic Rhinitis Patients in Rural Population. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 71:2057-2064
122. Small CB, Hernandez J, Reyes A, Schenkel E, Damiano A, Stryszak P, Staudinger H, Danzig M (2005) Efficacy and safety of mometasone furoate nasal spray in nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 116:1275-1281
123. Smith KA, Orlandi RR, Rudmik L (2015) Cost of adult chronic rhinosinusitis: A systematic review. *Laryngoscope* 125:1547-1556
124. Sridhar S, Schembri F, Zeskind J, Shah V, Gustafson AM, Steiling K, Liu G, Dumas YM, Zhang X, Brody JS, Lenburg ME, Spira A (2008) Smoking-induced gene expression changes in the bronchial airway are reflected in nasal and buccal epithelium. *BMC Genomics* 9:259
125. Stevens WW, Schleimer RP, Kern RC (2016) Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *J Allergy Clin Immunol Pract* 4:565-572

126. Stevens WW, Peters AT, Hirsch AG, Nordberg CM, Schwartz BS, Mercer DG, Mahdavinia M, Grammer LC, Hulse KE, Kern RC, Avila P, Schleimer RP (2017) Clinical Characteristics of Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps, Asthma, and Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease. *J Allergy Clin Immunol Pract* 5:1061-1070 e1063
127. Stuck BA, Beule A, Jobst D, Klimek L, Laudien M, Lell M, Vogl TJ, Popert U (2018) [Guideline for "rhinosinusitis"-long version : S2k guideline of the German College of General Practitioners and Family Physicians and the German Society for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery]. *HNO* 66:38-74
128. Tevis SE, Kennedy GD (2013) Postoperative complications and implications on patient-centered outcomes. *J Surg Res* 181:106-113
129. Tomassen P, Vandeplas G, Van Zele T, Cardell LO, Arebro J, Olze H, Forster-Ruhrmann U, Kowalski ML, Olszewska-Ziaber A, Holtappels G, De Ruyck N, Wang X, Van Drunen C, Mullol J, Hellings P, Hox V, Toskala E, Scadding G, Lund V, Zhang L, Fokkens W, Bachert C (2016) Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 137:1449-1456 e1444
130. van Agthoven M, Uyl-de Groot CA, Fokkens WJ, van de Merwe JP, Busschbach JJ (2002) Cost analysis of regular and filgrastim treatment in patients with refractory chronic rhinosinusitis. *Rhinology* 40:69-74
131. Wang ET, Zheng Y, Liu PF, Guo LJ (2014) Eosinophilic chronic rhinosinusitis in East Asians. *World J Clin Cases* 2:873-882
132. Wang X, Zhang N, Bo M, Holtappels G, Zheng M, Lou H, Wang H, Zhang L, Bachert C (2016) Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: A multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J Allergy Clin Immunol* 138:1344-1353
133. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, Wang L, Kirkesseli S, Rocklin R, Bock B, Hamilton J, Ming JE, Radin A, Stahl N, Yancopoulos GD, Graham N, Pirozzi G (2013) Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* 368:2455-2466
134. Wise SK, Laury AM, Katz EH, Den Beste KA, Parkos CA, Nusrat A (2014) Interleukin-4 and interleukin-13 compromise the sinonasal epithelial barrier and perturb intercellular junction protein expression. *Int Forum Allergy Rhinol* 4:361-370

135. Zhang Y, Gevaert E, Lou H, Wang X, Zhang L, Bachert C, Zhang N (2017) Chronic rhinosinusitis in Asia. *J Allergy Clin Immunol* 140:1230-1239
136. Zhou H, Zou B, Hazucha M, Carson JL (2011) Nasal nitric oxide and lifestyle exposure to tobacco smoke. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 120:455-459
137. Zhu Z, Wang W, Zhang X, Wang X, Zha Y, Chen Y, Zhou L, Lv W (2020) Nasal fluid cytology and cytokine profiles of eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology* 58:314-322



## 7 Publikationen / Danksagung

### 7.1 Publikationen

Originalpublikationen:

**Danisman Z\***, Linxweiler M\*, Kühn J, Linxweiler B, Solomayer E, Wagner M, Wagenpfeil G, Schick B, Berndt S (2023) **Value of differential nasal swab cytology for therapy monitoring and prediction of therapy response in chronic rhinosinusitis with nasal polyps treated with Dupilumab.** *Frontiers in Immunology.*

\*gleichberechtigte Erstautoren

Impact factor 2022: 8,786

Kongressbeiträge:

#### **93. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. (DGHNO) 2022, Hannover (Vortrag)**

Nutzen der nasalen Differentialzytologie zur Prädiktion des Therapieansprechens und Monitoring von CRSwNP-Patienten unter Dupilumab- eine monozentrische prospektive, klinische Anwendungsstudie. (Danisman Z, Berndt S, Takacs Z, Solomayer E-F, Schick B, Linxweiler M), *Laryngo-Rhino-Otologie* 101:149-149

Kongress-Stipendium der DGHNO-KHC (Christian Hempel-Stipendium der Fahlmedizintechnik GmbH) 2022 für Studenten\*innen

#### **94. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. (DGHNO) 2023, Leipzig (Poster)**

Prädiktion des Therapieansprechens und Therapiemonitoring von CRSwNP-Patienten unter Dupilumab-Therapie auf Basis der nasalen Differenzialzytologie – eine monozentrische, prospektive, klinische Anwendungsstudie. (Danisman Z, Berndt S, Takacs Z, Solomayer E-F, Schick B, Linxweiler M)

Kongress-Stipendium der DGHNO-KHC (Christian Hempel-Stipendium der Fahlmedizintechnik GmbH) 2023 für Studenten\*innen

## 7.2 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Maximilian Linxweiler für die Überlassung des interessanten Themas, seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während des gesamten Arbeitsprozesses und seiner ständigen Motivation. Die professionelle Unterstützung, fachliche Kompetenz, das Vermitteln der wissenschaftlichen Denkweisen und die ständige Erreichbarkeit habe ich zu keinem Zeitpunkt als selbstverständlich angesehen. Sein Engagement und die intensive Betreuung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Sehr dankbar bin ich zudem Barbara Linxweiler, die mich mit ihrer langjährigen Erfahrung, ihrem persönlichem Engagement, ihren vielen Ratschlägen, den zielführenden Diskussionen und wichtigen Anregungen bei der experimentellen Arbeit tatkräftig unterstützt hat. Sie stand mir mit ihrer freundlichen Art stets zur Seite, setzt sich immer für ihre Doktorandinnen ein und hat immer ein offenes Ohr für mich.

Dr. Sabrina Berndt danke ich herzlich für die Datenerhebung sowie der Patientenrekrutierung. Auch danke ich ihr für ihren Einsatz bei dem Verfassen meiner Publikation. Außerdem gilt mein Dank den netten Damen aus dem Zytologielabor der Klinik für Frauenheilkunde, die mich herzlich aufgenommen haben und mich bei der Färbung der MGG-Präparate unterstützt haben, sowie Herrn Prof. Dr. med. E. F. Solomayer, der es mir ermöglicht hat die Infrastruktur seiner Klinik für meine Promotionsarbeit zu nutzen. Auch den Mitarbeiterinnen aus dem HNO-Labor, vor allem Sandrina Körner, danke ich sehr für die Unterstützung am Mikroskop. Frau Wagenpfeil danke ich vielfach für ihre freundliche Beratung und Hilfe. Frau PD Dr. rer. nat. Walch-Rückheim danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der Granulozyten-Konzentrate. Des Weiteren möchte ich allen Studienteilnehmern für ihre Teilnahme danken, ohne sie wäre diese Datensammlung nicht zustande gekommen.

Für die moralische Unterstützung und die zahlreichen Gespräche während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation gilt mein Dank meiner Familie und Freunden. Ganz besonders meinen sechs Schwestern und drei Brüdern, die in allen Lebenslagen für mich da sind und immer die richtigen Worten finden. Auch meinen Eltern Ibrahim und Emine Danisman bin ich von Herzen dankbar für die ständigen aufbauenden Worte und den Rückhalt in allen Lebenslagen. Durch ihre liebevolle und bedingungsvolle Unterstützung weiß ich, dass alles möglich ist, wenn man hart für etwas arbeitet. Sie werden mir immer die größten Vorbilder sein. Aus diesem Grund widme ich diese Arbeit meiner Familie.

## 8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.







## 9 Anhang

### 9.1 Patienteninformation



Patientenetikett

**Patienteninformation zur Erlangung der Einwilligung in die Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie sowie die wissenschaftliche Verwendung personenbezogener Daten zu Forschungszwecken**

“ Therapiemonitoring einer systemischen Dupilumab-Therapie bei Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinusitis (CRSwNP) mittels nasaler Abstrichzytologie ”

Studienleiter:

PD Dr. med. Maximilian Linxweiler, MHBA  
HNO-Klinik, Universitätsklinikum des Saarlandes  
Kirrbergerstr. 100, Geb. 6; 66421 Homburg  
[maximilian.linxweiler@uks.eu](mailto:maximilian.linxweiler@uks.eu); 06841-1622942

Dr. med. Sabrina Berndt  
HNO-Klinik, Universitätsklinikum des Saarlandes  
Kirrbergerstr. 100, Geb. 6; 66421 Homburg  
[sabrina.berndt@uks.eu](mailto:sabrina.berndt@uks.eu); 06841-1622942

Sehr geehrter Patient/ Sehr geehrte Patientin,

als Mitarbeiter einer Universitätsklinik sind wir als Ärzte/Ärztinnen der Hals-Nasen-Ohrenklinik neben unserer Aufgabe Ihrer medizinischen Behandlung auch um ein bestmögliches Engagement in der studentischen Ausbildung und medizinischen Wissenschaft bemüht. Es ist uns ein großes Anliegen, zum einen die Begeisterung für unseren Beruf auch an den medizinischen Nachwuchs weitergeben zu können und zum anderen durch wissenschaftliche Arbeiten den medizinischen Fortschritt voranzutreiben, um eine immer bessere medizinische Versorgung für unsere Patienten zu ermöglichen. Vor diesem Hintergrund führen wir derzeit eine klinische Studie mit dem Titel „Therapiemonitoring einer systemischen Dupilumab-Therapie bei Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinusitis (CRSwNP) mittels nasaler Abstrichzytologie“ durch. Im Folgenden wollen wir Sie über die Zielsetzung sowie den zeitlichen und inhaltlichen Ablauf dieser Studie informieren.

#### Stand der Forschung

Bei einem Teil der Patienten mit einer chronischen Nasennebenhöhlenentzündung bildet die erkrankte Schleimhaut sogenannte Polypen aus, die als Folge eines chronischen Entzündungsprozesses entstehen und häufig ein kontinuierliches Wachstum bis hin zur kompletten Verlegung der inneren Nase zeigen. Als Folge entwickeln die betroffenen Patienten als Symptome u.a. chronische Kopfschmerzen, ein Druckgefühl im Bereich der Nasennebenhöhlen, eine Riech- und Schmeckminderung, eine Nasenatmungsbehinderung und eine chronische Nasensekretion. Als Therapieverfahren stehen seit vielen Jahrzehnten die lokale Therapie mit einem cortisonhaltigen Nasenspray sowie eine endoskopische Entfernung der Polypen (Nasennebenhöhlen-Operation) zur Verfügung. In einzelnen, schweren Fällen muss sogar auf eine systemische Cortisonbehandlung zurückgegriffen werden. Dennoch gibt es immer wieder Patienten mit einer chronisch-polypösen Sinusitis, bei denen die Erkrankung auch durch eine lokale und/oder systemische Cortisontherapie und durch mehrfache Nasennebenhöhlenoperationen nicht ausreichend kontrolliert werden kann und immer wieder zurückkehrt. In



klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Bildung von Nasenpolypen eine chronische sogenannte Typ-II-Entzündung zugrunde liegt. Schlüssel-moleküle dieses Entzündungsprozesses sind die Botenstoffe IL-4 und IL-13. Mit dem Antikörper Dupilumab wurde ein therapeutischer Antikörper entwickelt, der die Aktivität dieser Schlüssel-moleküle der Typ-II-Entzündung unterdrückt und der bereits bei Patienten mit chronischem Asthma und Neurodermitis eingesetzt wird – Krankheitsbilder deren molekulare Grundlage ebenfalls von einer chronischen Typ-II-Entzündung geprägt wird. Nachdem in weiteren klinischen Studien auch gezeigt wurde, dass Patienten mit einer chronisch-polypösen Nasennebenhöhlenentzündung von Dupilumab hinsichtlich des Polypenwachstums und der Symptome profitieren, wurde der Antikörper im November 2019 zur Behandlung dieser Patienten in einer Kombinationsbehandlung mit lokalen Steroiden zugelassen, sofern die Erkrankung durch eine systemische Behandlung mit Cortison und durch Nasennebenhöhlenoperationen nicht ausreichend kontrolliert werden kann.

### Ziele der Studie

Um nun sehen zu können, ob eine chronische Typ-II-Entzündung bei einem Patienten mit einer chronisch-polypösen Nasennebenhöhlenentzündung vorliegt, ist man entweder auf eine Gewebeprobe oder auf Surrogatparameter wie bestimmte Blutwerte angewiesen. Da diese Parameter entweder nur invasiv bestimmt werden können oder für die Fragestellung nicht ausreichend aussagekräftig sind, fehlen derzeit noch zuverlässige Marker, die anzeigen ob tatsächlich eine Typ-II-Entzündung der Nasenschleimhaut vorliegt und damit eine Dupilumab-Therapie vielversprechend ist. Mit der nasalen Abstrichzytologie steht an unserer Klinik eine nicht-invasive und nicht bis nur sehr wenig schmerzhaft Methode zur Gewinnung nasaler Zellen zur Verfügung. Mit dieser Methode können die Schleimhaut- und Entzündungszellen der Nase auf das Vorliegen einer Typ-II-Entzündung untersucht werden. Wir erhoffen uns daher in dieser Studie zeigen zu können, dass durch die Untersuchung der Schleimhaut- und Entzündungszellen der Nase vor und während einer Dupilumab-Therapie zum einen das Therapieansprechen vorhergesagt werden kann und zum anderen eine Überwachung des Ansprechens der Entzündung auf zellulärer Ebene unter der Therapie möglich ist. So könnten in Zukunft noch gezielter die Patienten mit einer chronisch-polypösen Nasen-

nebenhöhlenentzündung ausgewählt werden, die wahrscheinlich von einer Dupilumab-Therapie profitieren und das Ansprechen auf die Therapie könnte besser überwacht werden.

### Ablauf der Studie

Sollten Sie sich für eine Teilnahme an unserer Studie entscheiden, erfolgt die Durchführung eines Nasenabstrichs vor Beginn der Dupilumab-Therapie sowie insgesamt viermal während der Therapie (in einem zeitlichen Abstand von je 3 Monaten). Durch die Teilnahme an der Studie werden keine zusätzlichen Krankenhausbesuche erforderlich, die jeweilige Untersuchungszeit im Rahmen des ambulanten Termins verlängert sich um maximal 5 Minuten.

### Nutzen-Risiko-Abwägung

Da es sich bei der nasalen Abstrichzytologie um eine rein diagnostische, nicht invasive Maßnahme handelt, mit der wir an unserer Klinik bereits eine langjährige Erfahrung haben, entstehen für Sie durch die Teilnahme an der Studie keinerlei Nachteile. Prinzipiell ist es denkbar, dass während der Abstrichentnahme die Nasenschleimhaut verletzt wird und es in der Folge zu einem Nasenbluten kommen kann. Sollte sich dieses nicht durch eine bipolare Elektrokoagulation oder reine Kompression bzw. die Anwendung von Nasenspray stillen lassen, kann im schlimmsten Fall auch die Einlage von Nasentamponaden verbunden mit einer stationären Aufnahme notwendig sein. Dies haben wir jedoch in den vergangenen Jahren bei weit über 250 Abstrichen noch nie beobachtet.

### Pseudonymisierung der Daten und Datenschutz

Alle im Rahmen der Studie gewonnen, personenbezogenen Daten werden für die weitere wissenschaftliche Auswertung und eine mögliche Veröffentlichung der Daten pseudonymisiert, was bedeutet, dass keinerlei Rückschlüsse von außenstehenden Personen auf persönliche Daten der Studienteilnehmer möglich sind. Lediglich der

Studienleiter kennt die Zuordnung der verwendeten Pseudonyme zu den personenbezogenen Daten der Studienteilnehmer. Ausführliche Erläuterungen zur Pseudonymisierung der Daten und dem Datenschutz finden Sie in einer gesonderten „Datenschutzerklärung“, die Ihnen zusammen mit dieser Aufklärung ausgehändigt wird.

#### Widerrufbarkeit der Einwilligung

Ihre Einwilligung in die Teilnahme an der Studie können Sie jederzeit widerrufen. In einem solchen Falle werden alle bis dahin für wissenschaftliche Zwecke generierten, personenbezogenen klinischen Daten vernichtet und nicht mehr für die Auswertung der Studie verwendet. Eine primäre Verweigerung der Teilnahme an der Studie ist für Sie mit keinerlei Nachteilen hinsichtlich der medizinischen Behandlung in unserer Klinik verbunden.

Wir hoffen, Sie mit dieser Aufklärung in ausreichendem Maße über den Inhalt, die Ziele und die praktische Durchführung unserer Studie informiert zu haben und wären Ihnen sehr dankbar, wenn Sie uns durch eine Teilnahme an der Studie in unserem Bemühen um den medizinischen Fortschritt und die Verbesserung der Patientenversorgung unterstützen. Sollten sie weitere Fragen haben können Sie uns jederzeit telefonisch (06841/1622942) oder per email ([sabrina.berndt@uks.eu](mailto:sabrina.berndt@uks.eu); [maximilian.linxweiler@uks.eu](mailto:maximilian.linxweiler@uks.eu)) kontaktieren.

## 9.2 Einwilligungserklärung



**UKS**  
Universitätsklinikum  
des Saarlandes

Patientenetikett

### **Einwilligung in die Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie sowie die wissenschaftliche Verwendung personenbezogener Daten zu Forschungszwecken**

“ Therapiemonitoring einer systemischen Dupilumab-Therapie bei Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinusitis (CRSwNP) mittels nasaler Abstrichzytologie ”

#### Studienleiter:

PD Dr. med. Maximilian Linxweiler, MHBA  
HNO-Klinik, Universitätsklinikum des Saarlandes  
Kirrbergerstr. 100, Geb. 6; 66421 Homburg  
[maximilian.linxweiler@uks.eu](mailto:maximilian.linxweiler@uks.eu); 06841-1622942

Dr. med. Sabrina Berndt  
HNO-Klinik, Universitätsklinikum des Saarlandes  
Kirrbergerstr. 100, Geb. 6; 66421 Homburg  
[sabrina.berndt@uks.eu](mailto:sabrina.berndt@uks.eu); 06841-1622942

Mit meiner Unterschrift willige ich in die Teilnahme an der Studie "Therapiemonitoring einer systemischen Dupilumab-Therapie bei Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinusitis (CRSwNP) mittels nasaler Abstrichzytologie" ein. Ich wurde zuvor ausführlich über den Inhalt, die Ziele und die praktische Durchführung der Studie sowie evtl. mit einer Teilnahme verbundene Risiken informiert.

---

---

Ort, Datum

---

Name des Studienteilnehmers

---

Unterschrift Studienteilnehmer

---

Name des aufklärenden Arztes

---

Unterschrift aufklärender Arzt

## 9.3 Datenschutzaufklärung



### Datenschutzerklärung

#### **“ Therapiemonitoring einer systemischen Dupilumab-Therapie bei Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinusitis (CRSwNP) mittels nasaler Abstrichzytologie ”**

##### Studienleiter:

PD Dr. med. Maximilian Linxweiler, MHBA  
HNO-Klinik, Universitätsklinikum des Saarlandes  
Kirrbergerstr. 100, Geb. 6; 66421 Homburg  
[maximilian.linxweiler@uks.eu](mailto:maximilian.linxweiler@uks.eu); 06841-1622942

Dr. med. Sabrina Berndt  
HNO-Klinik, Universitätsklinikum des Saarlandes  
Kirrbergerstr. 100, Geb. 6; 66421 Homburg  
[sabrina.berndt@uks.eu](mailto:sabrina.berndt@uks.eu); 06841-1622942

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, d.h. ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der Studie teilnehmen.

### **Einwilligungserklärung zum Datenschutz**

1) Ich willige ein, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern in der HNO-Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes aufgezeichnet werden.

2) Außerdem willige ich ein, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte der Studienleiter (Priv.-Doz. Dr. med. M. Linxweiler, MHBA; Dr. med. Sabrina Berndt) in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

3) Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist prinzipiell widerruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der Studie beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten in anonymisierter Form weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um

a) den diagnostischen Nutzen der zu prüfenden diagnostischen Methode der nasalen Abstrichzytologie festzustellen

b) sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden

4) Ich willige ein, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden, wie es die Vorschriften für klinische Studien bestimmen. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

5) Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten gespeichert haben, ohne weitere Prüfung der Gründe unverzüglich löschen.

---

Ort, Datum

---

Name des Studienteilnehmers

---

Unterschrift Studienteilnehmer

---

Name des aufklärenden Arztes

---

Unterschrift aufklärender Arzt



## 9.4 Indikationsstellung zur Therapie der CRSwNP mit Biologika

**AEDA** Ärzteverband  
Deutscher  
Allergologen e.V.



### Indikationsstellung zur Therapie der chronischen Rhinosinusitis mit Nasenpolypen (CRSwNP; Polyposis nasi) mit Biologika<sup>1</sup>

nach Klimek L. et al.: Positionspapier Anwendung von Biologika bei chronischer Rhinosinusitis mit Polyposis nasi (CRSwNP) im deutschen Gesundheitssystem von AEDA und DGHOKHC, LRO 2020

#### Allgemeine Daten:

Name: ..... Vorname: ..... Geburtsdatum: .....

Indikation (ICD-10): ...  J33.1...  J33.8  J33.9... CRSwNP besteht seit: .....  
(Mehrfachnennung möglich)

#### Eignungskriterien:

Gemäß des Positionspapiers **Anwendung von Biologika bei chronischer Rhinosinusitis mit Polyposis nasi (CRSwNP) im deutschen Gesundheitssystem<sup>1</sup>** besteht die Indikation zur Behandlung mit Biologika für Patienten, bei denen nachfolgende Kriterien erfüllt sind:

Alter:   $\geq 18$  Jahre  Nein  Ja  
Diagnose:  schwere CRSwNP  Nein  Ja  
Aktuelle Behandlung mit nasalen GKS:  Nein  Ja  
Einschränkung der Lebensqualität (QoL):  Nein  Ja, ggfls. SNOT-22 Score: .....  
Vorbehandlung mit systemischen GKS und/oder vorausgehende NNH-OP:  Nein  Ja

(Indikationsstellung nur, wenn 5mal „Ja“ angekreuzt wurde)

#### Spezifizierung der Eignungskriterien:

Vorbehandlung mit systemischen GKS:  Nein  Ja,  
ca. .... mal in den letzten 5 Jahren, zuletzt: .....Wirkstoff: ....., Dosis mg: ..... über .....Tage  
NNH-Operationen:  Nein  Ja, insgesamt: ....mal, davon in den letzten 10 Jahren: ....mal, zuletzt: .....

#### Zusätzliche Klinische Eignungskriterien:

Nachweis / Hinweis auf eine zugrundeliegende Typ-2-Inflammation:  Nein  Ja  
Nasaler Polypen-Score  $\geq 4$  von 8 (NPS: .....):  Nein  Ja  
Kontraindikationen für NNH-Operation trotz gegebener OP-Indikation:  Nein  Ja  
Kontraindikationen für systemische GKS trotz gegebener Indikation:  Nein  Ja  
beidseitige Polyposis nasi:  Nein  Ja  
Nachweis signifikante Riechstörung:  Nein  Ja  
Sniffin´ Sticks Score: .....  
UPSIT Score: .....  
anderer Riechtest: ..... (welcher? .....) )

bekanntes Asthma bronchiale:  Nein  Ja  
bekannte Neurodermitis:  Nein  Ja  
bekanntes ASS-Intoleranz-Syndrom (N-ERD, M. Samter):  Nein  Ja  
„Early onset“ CRSwNP:  Nein  Ja  
Ausschluß andere Ursache:  Nein  Ja  
(wie z.B. Mukozelen; Mukoviszidose etc.)

Sonstiges (z.B. relevante Begleiterkrankungen etc.) .....  
.....

Indikation ist gegeben:  Nein  Ja

Therapieeinleitung mit: .....

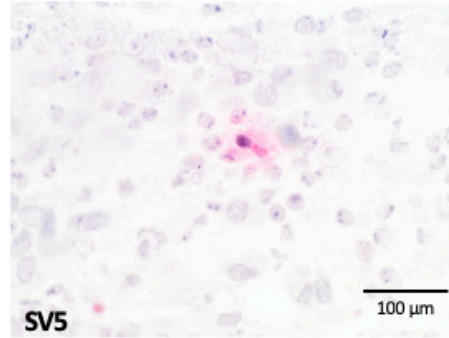
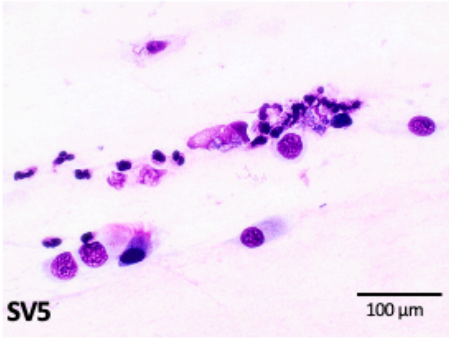
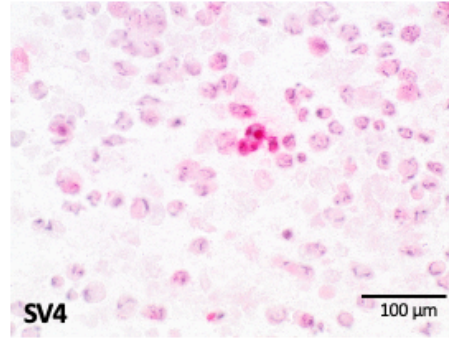
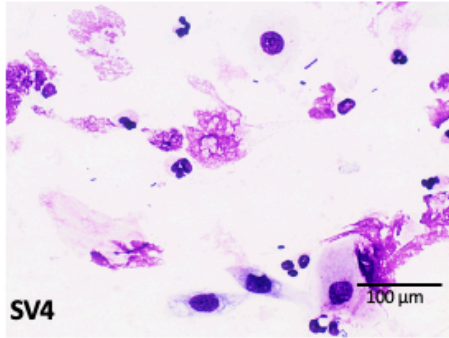
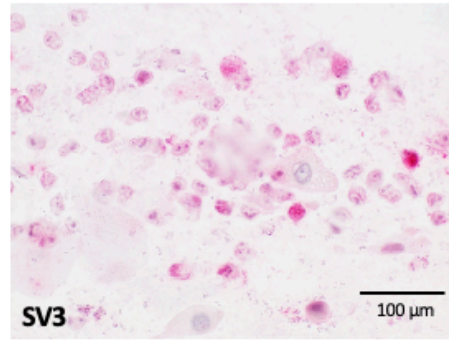
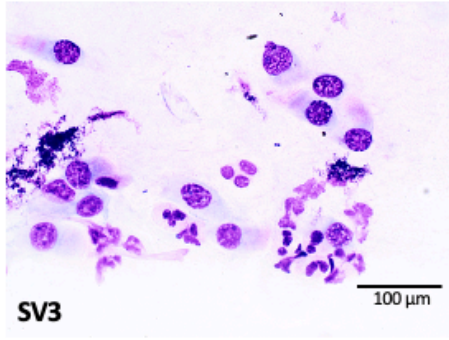
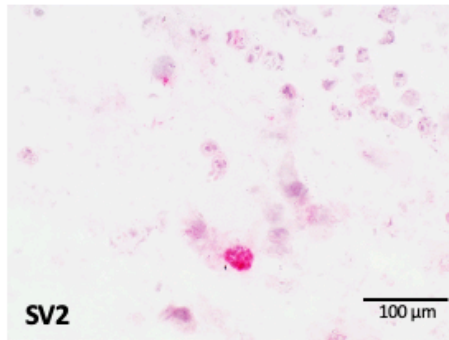
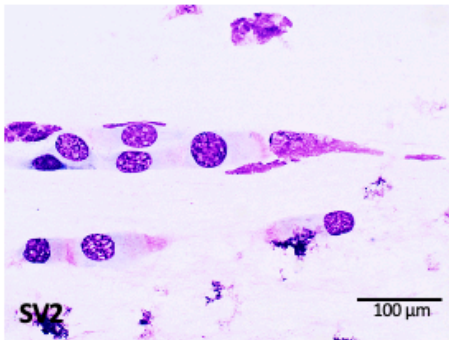
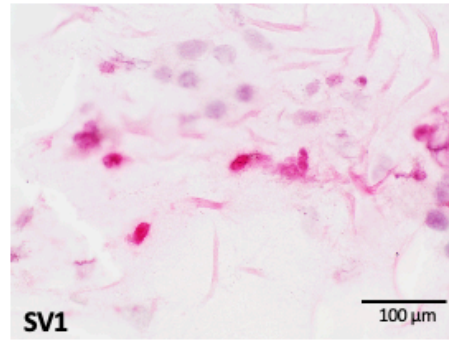
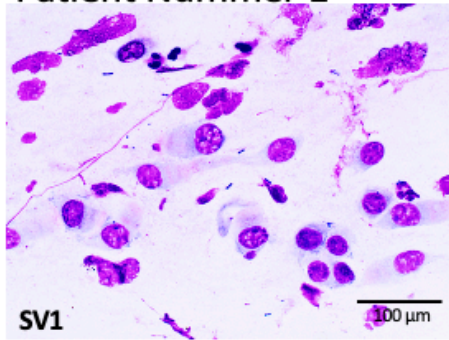
Datum: ..... Unterschrift: .....

CRSwNP: Chronische Rhinosinusitis mit Nasenpolypen // GKS: Glukokortikosteroide // UPSIT: University of Pennsylvania Smell Identification Test // N\_ERD: Non-steroidal anti-inflammatory Drugs // QoL: Quality of Life

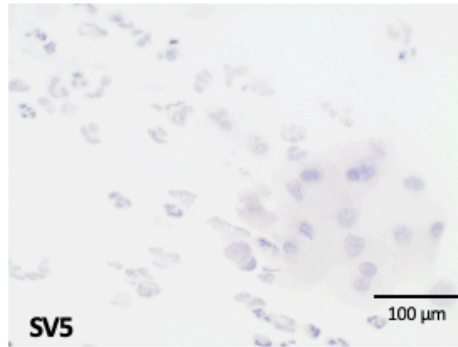
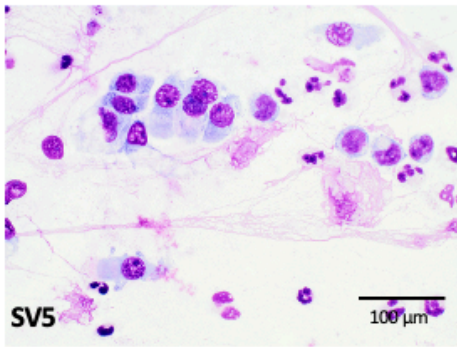
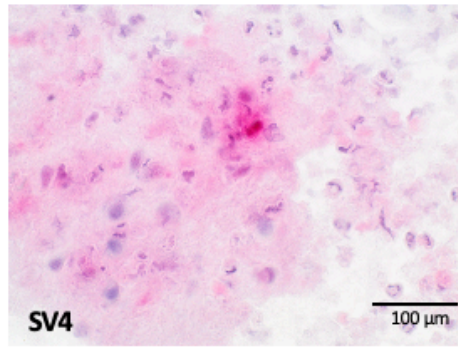
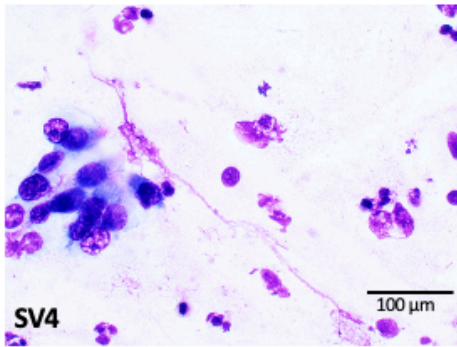
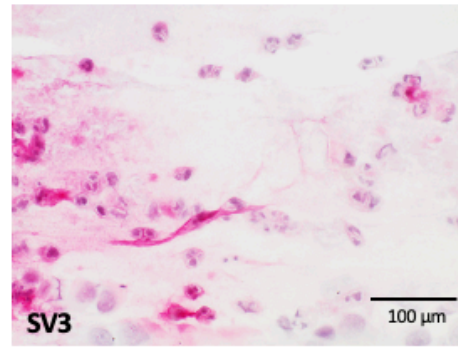
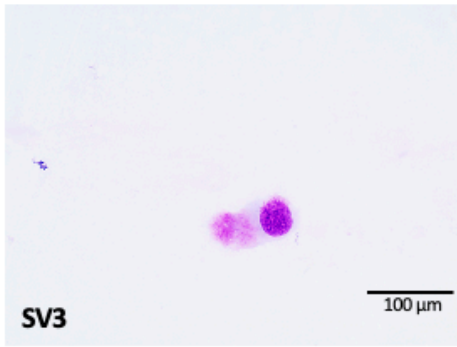
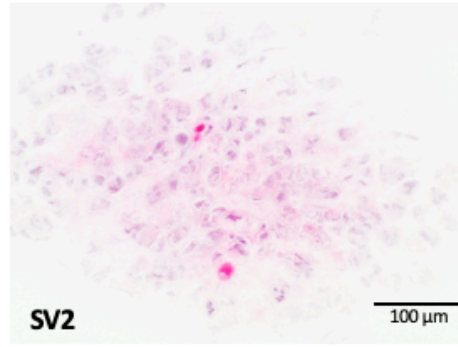
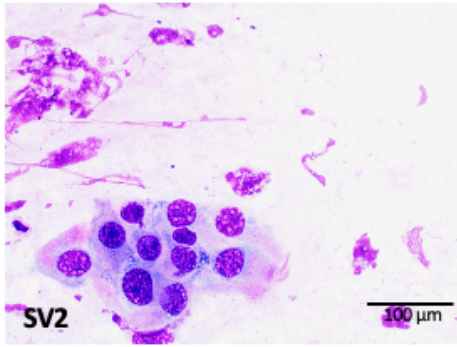
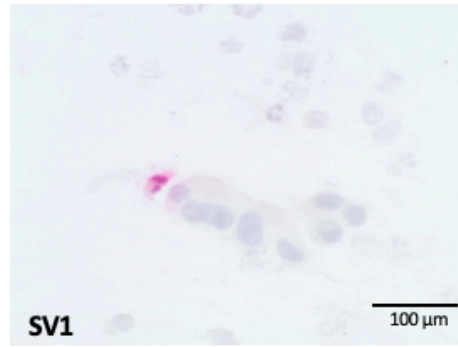
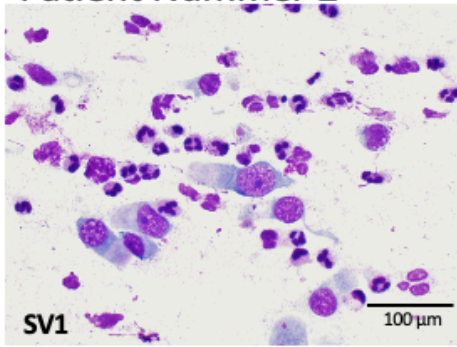
© Professor L. Klimek, Wiesbaden

9.5 MGG- und ICC-Bilder

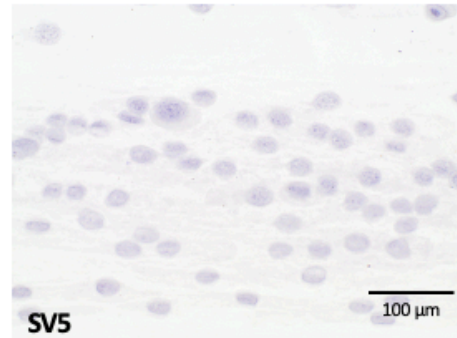
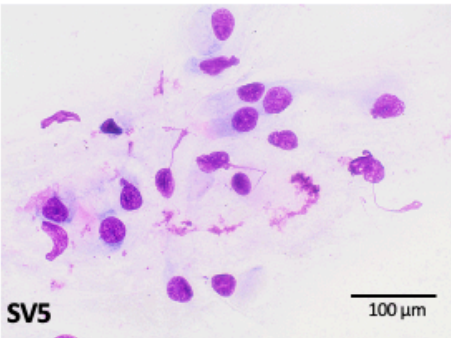
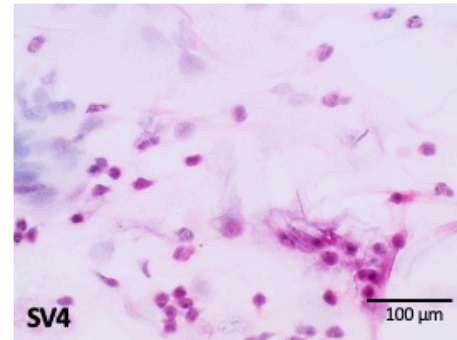
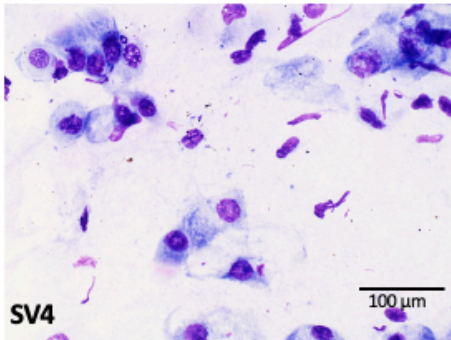
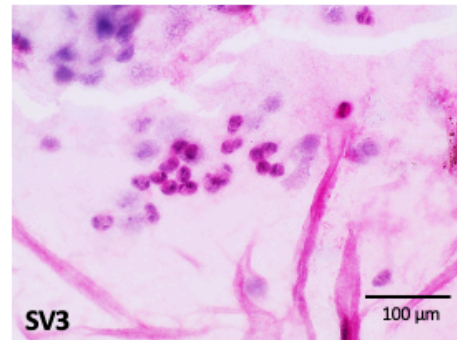
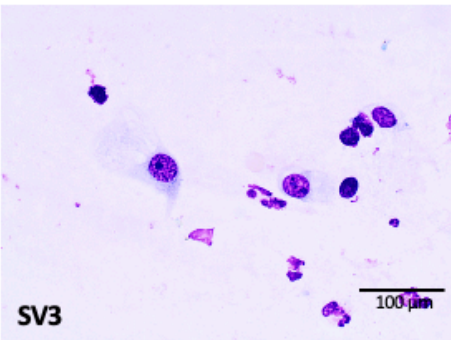
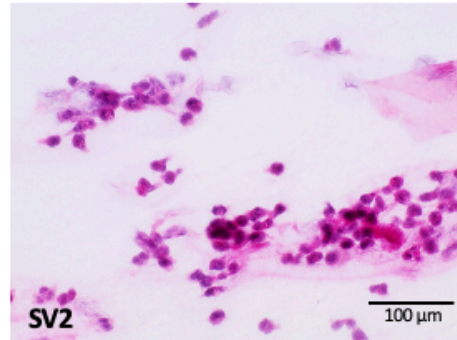
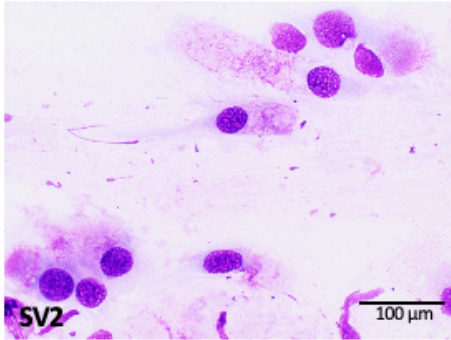
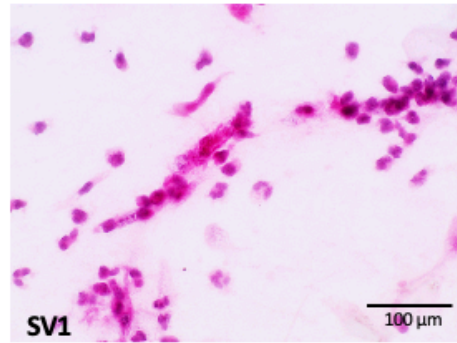
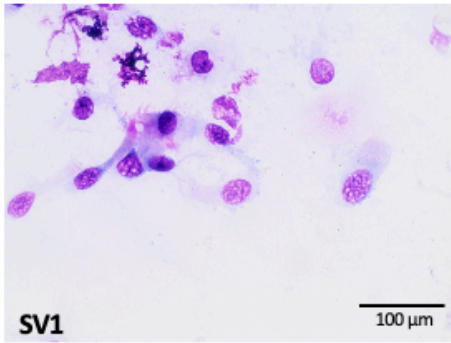
Patient Nummer 1



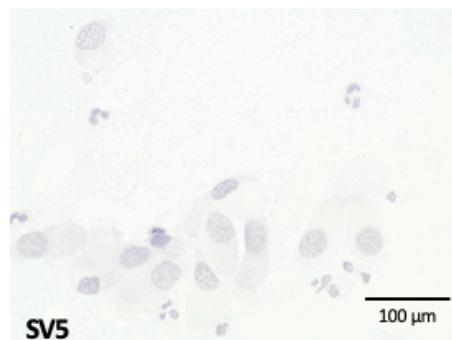
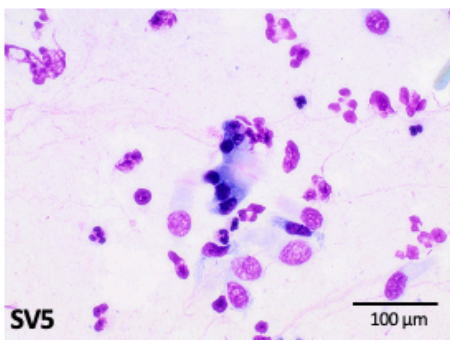
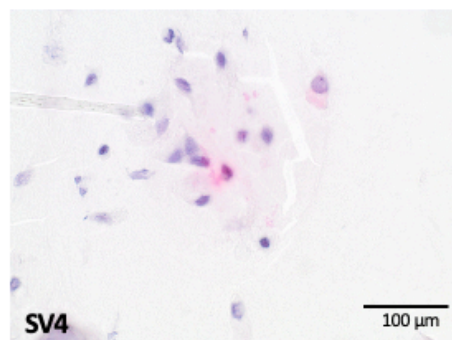
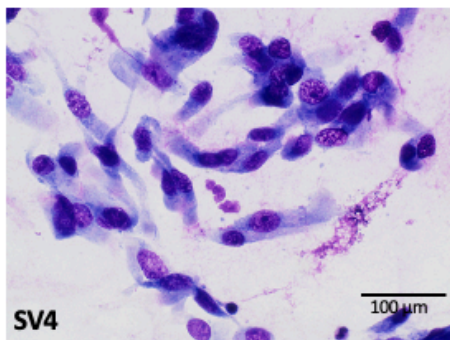
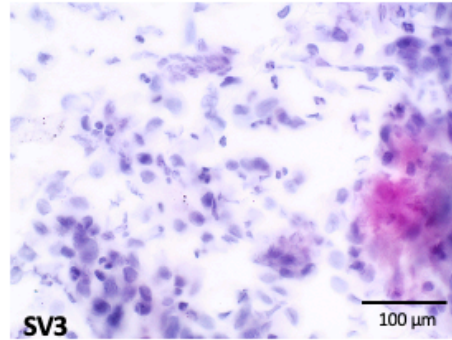
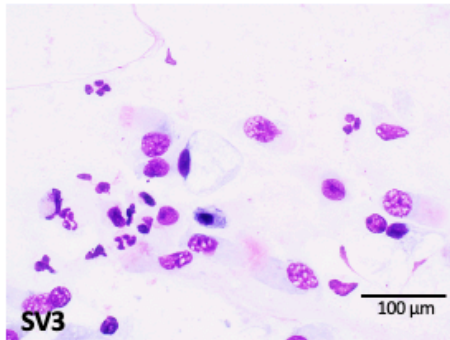
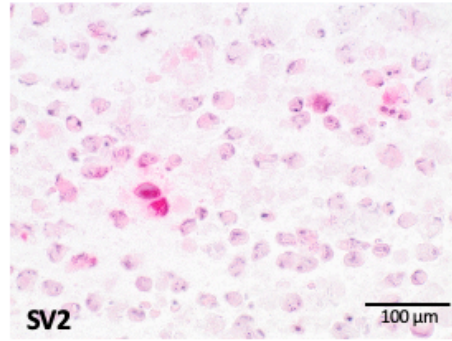
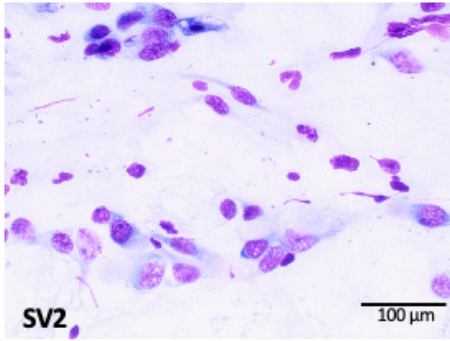
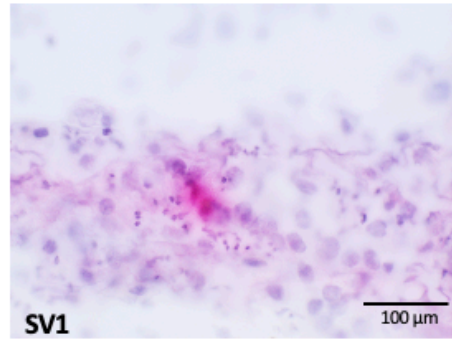
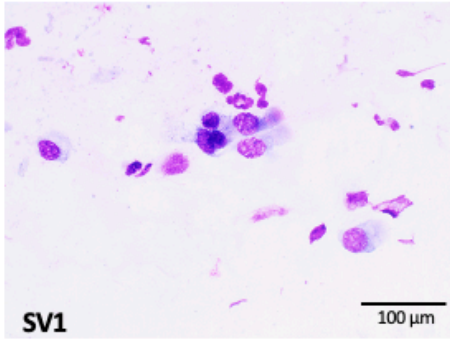
Patient Nummer 2



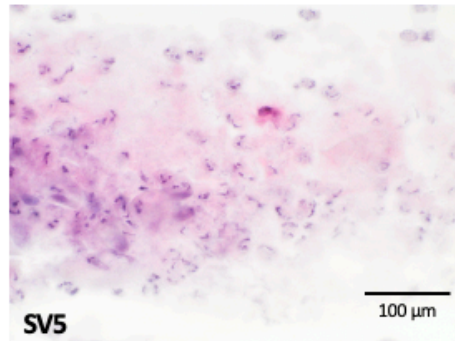
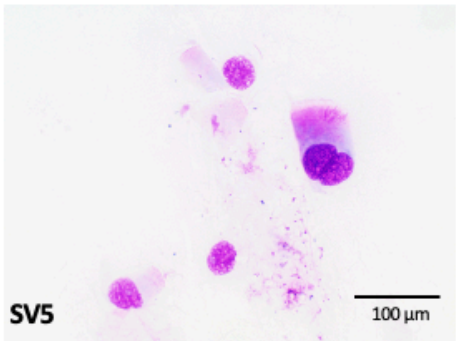
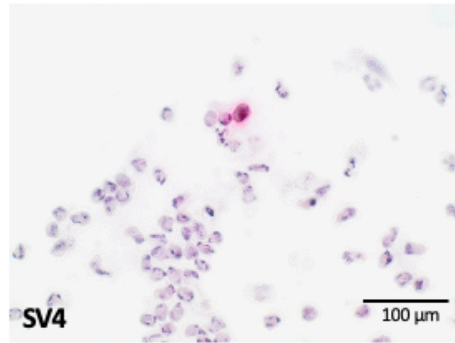
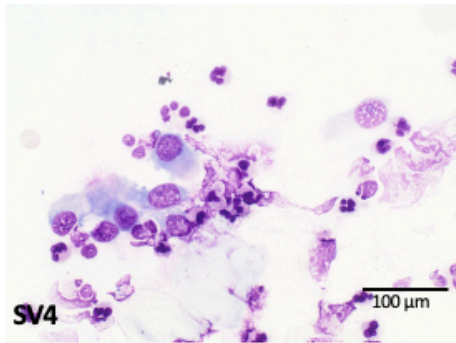
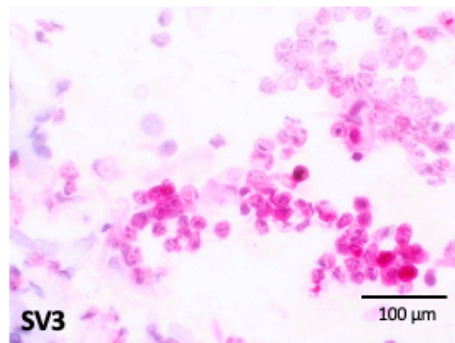
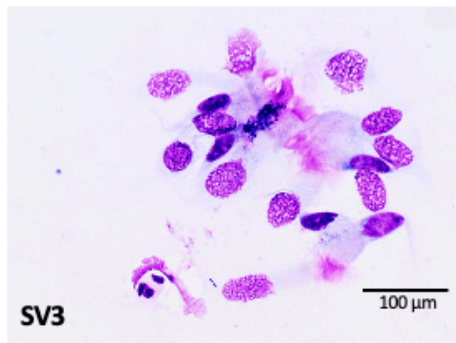
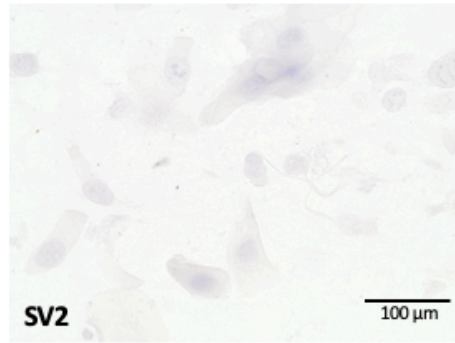
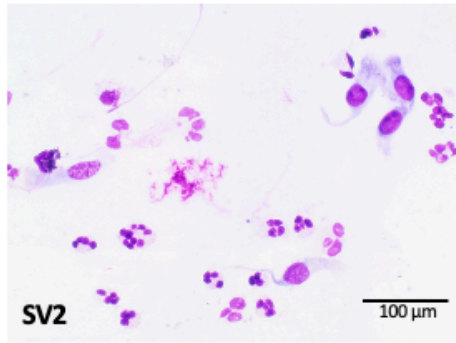
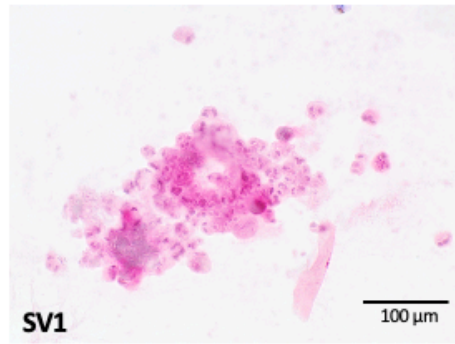
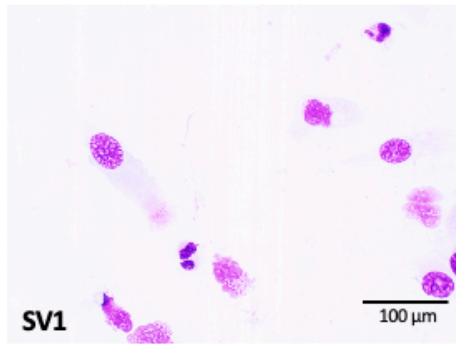
Patient Nummer 3



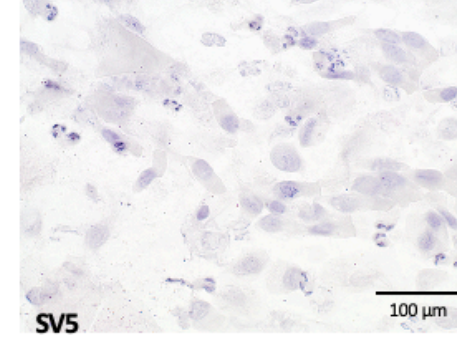
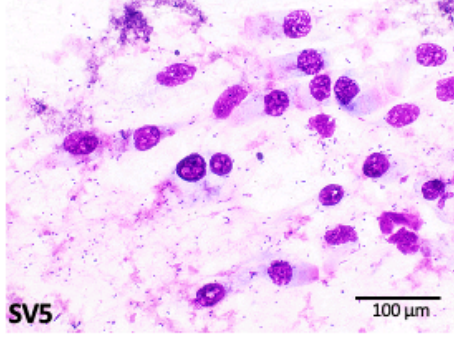
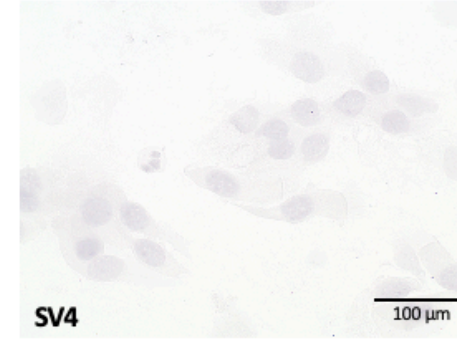
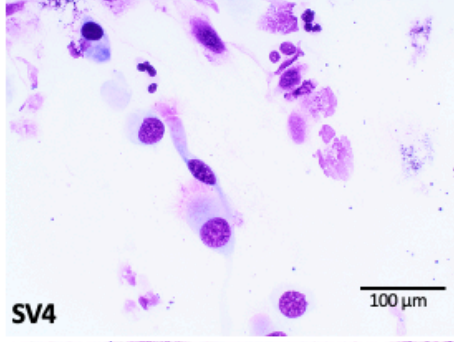
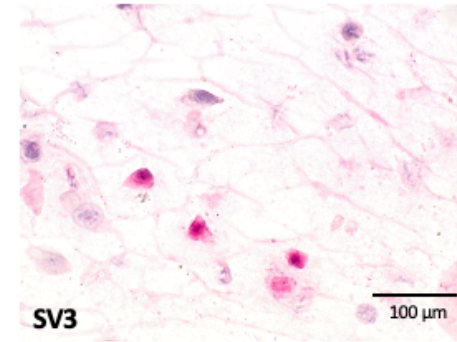
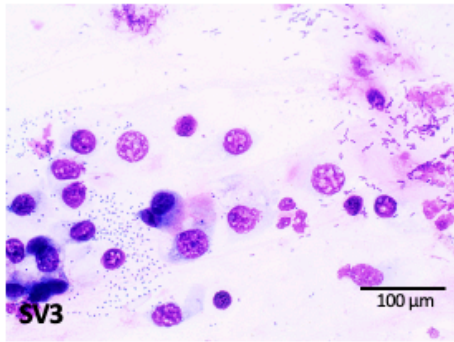
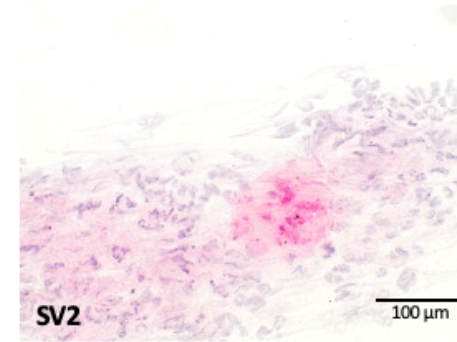
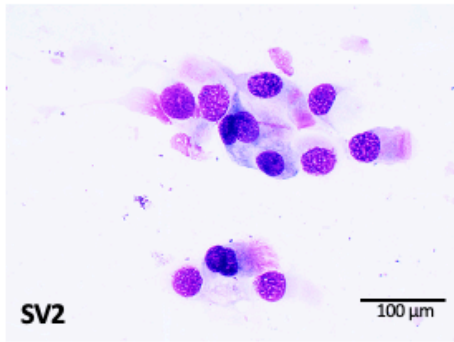
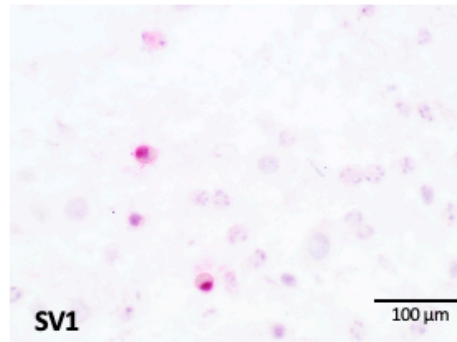
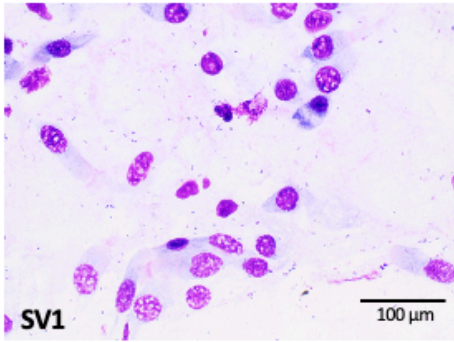
Patient Nummer 4



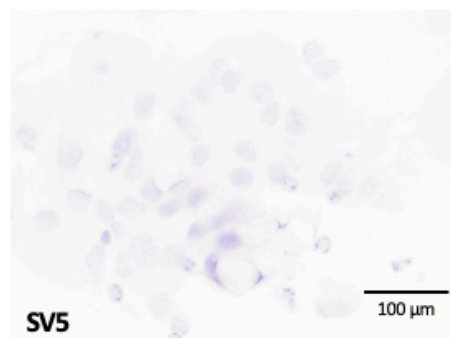
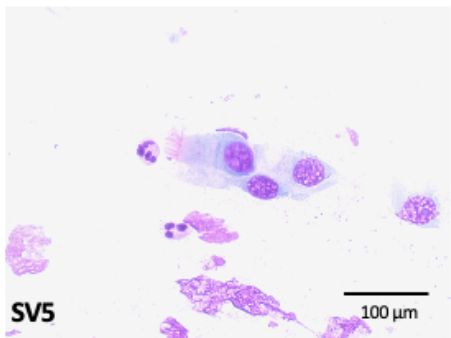
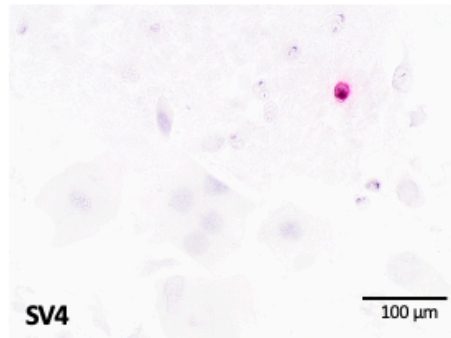
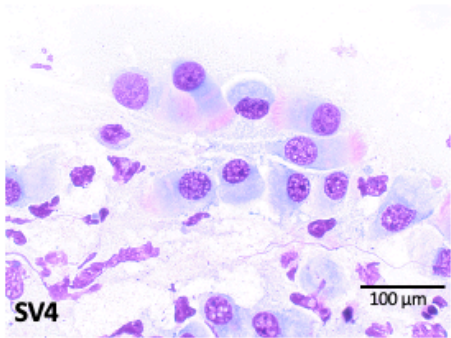
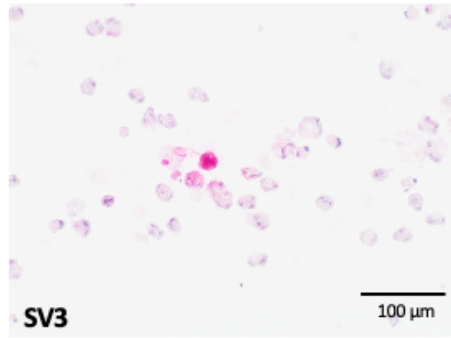
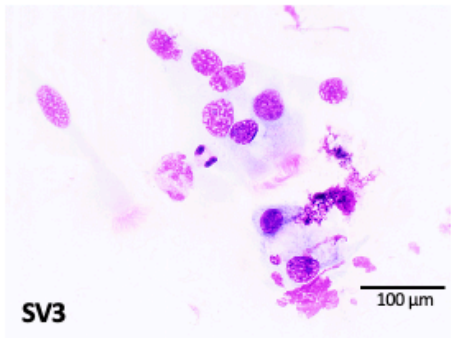
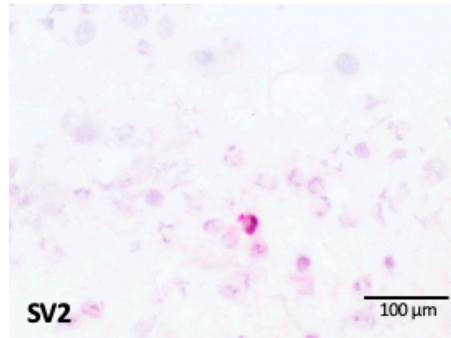
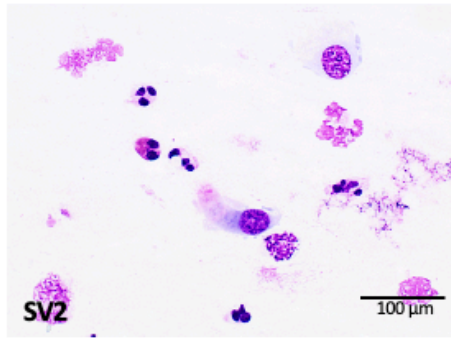
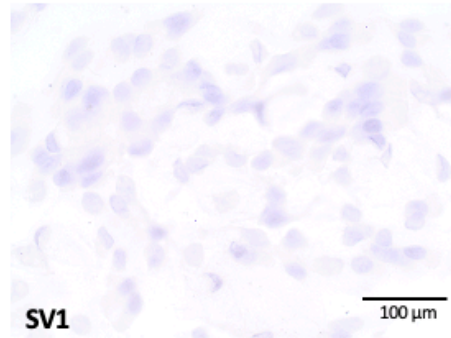
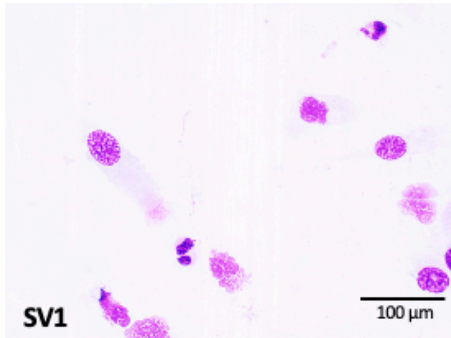
Patient Nummer 5



Patient Nummer 6

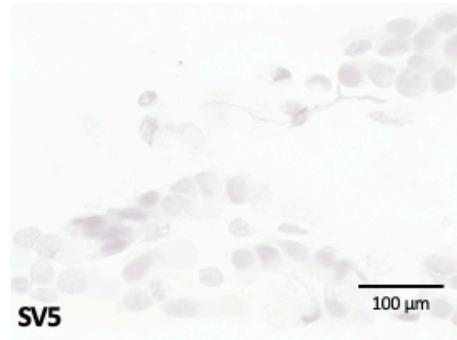
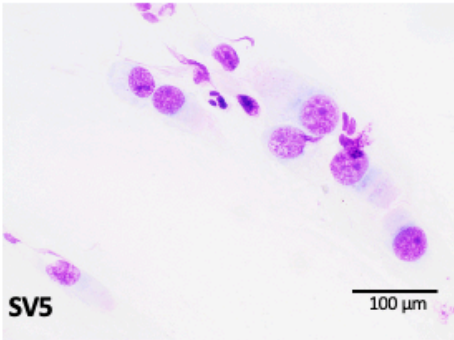
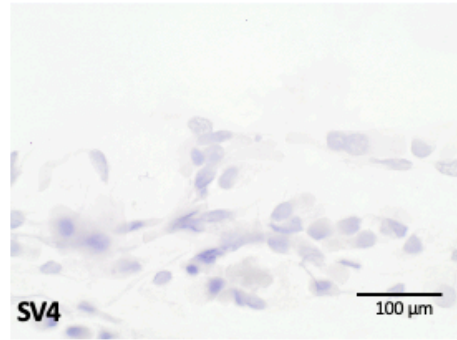
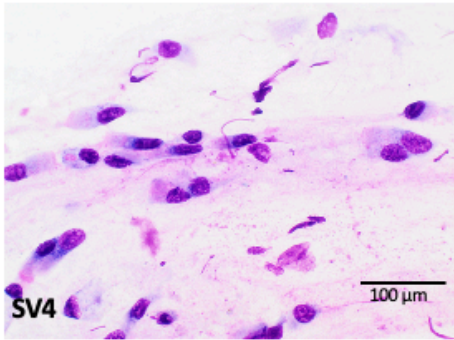
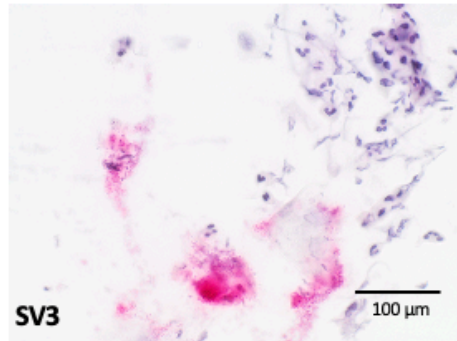
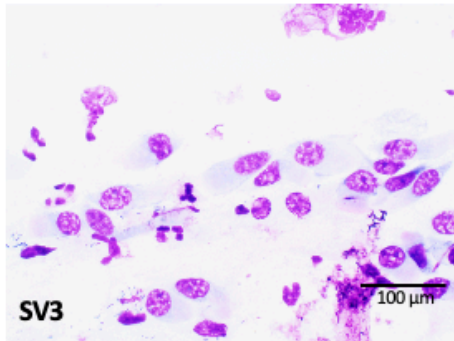
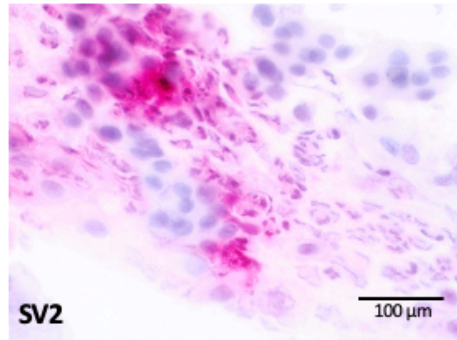
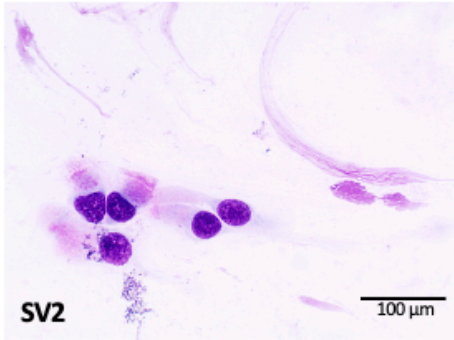
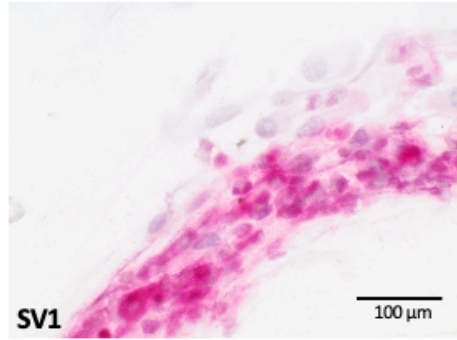
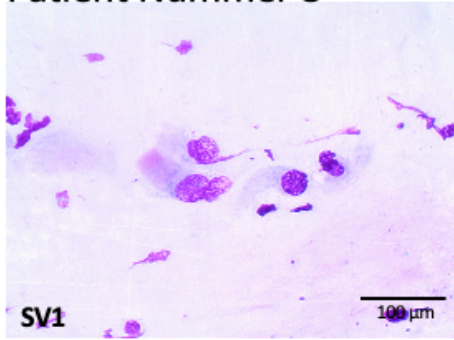


Patient Nummer 7

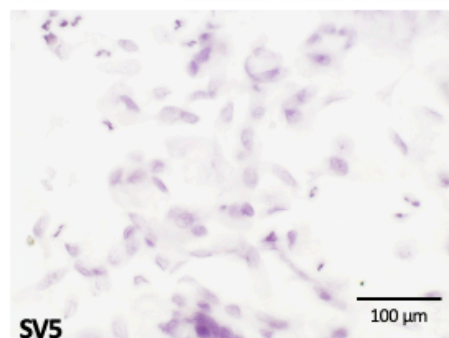
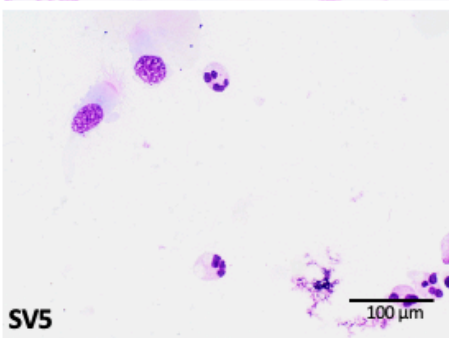
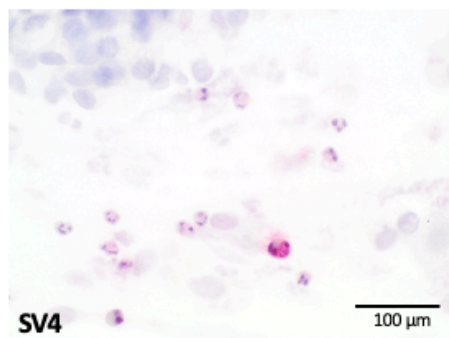
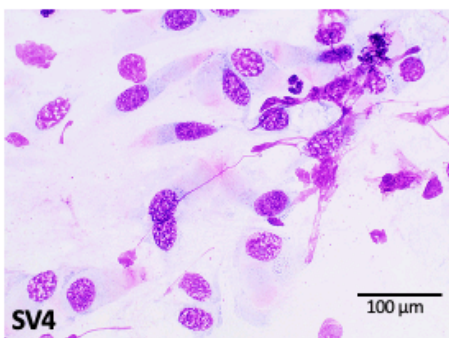
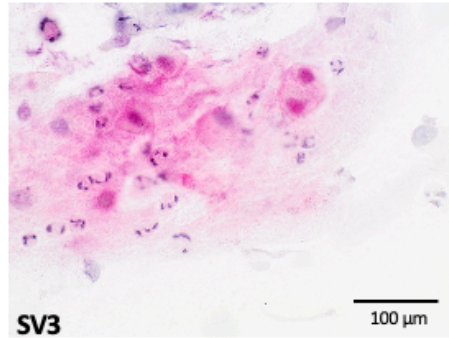
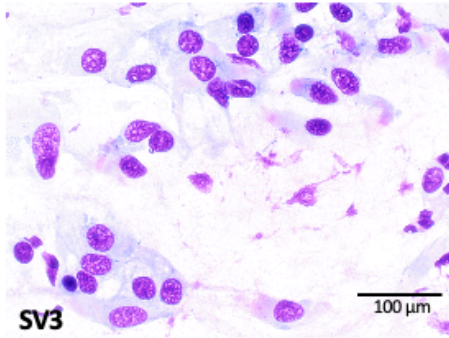
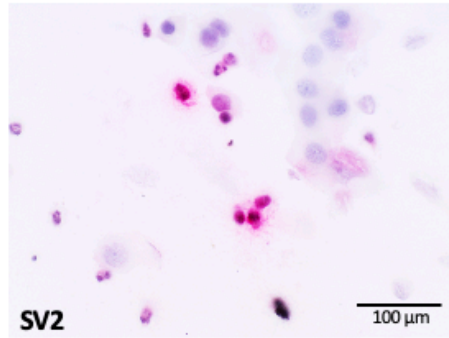
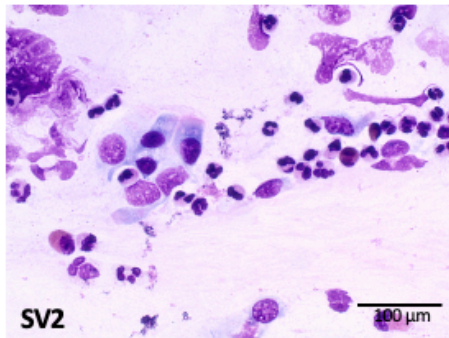
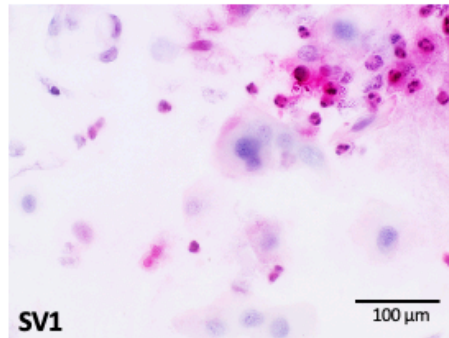
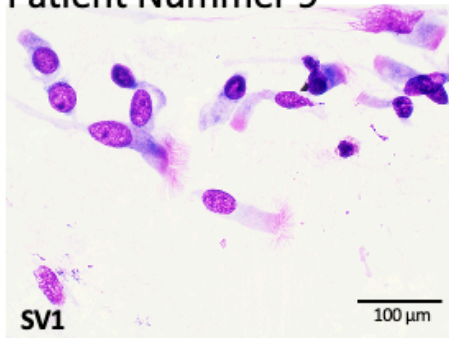




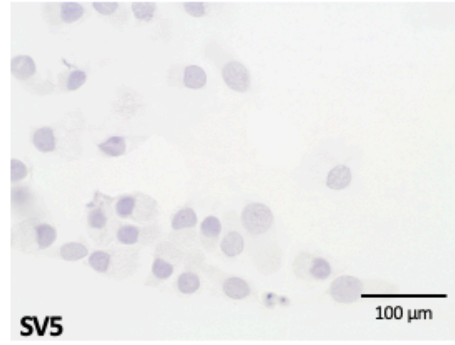
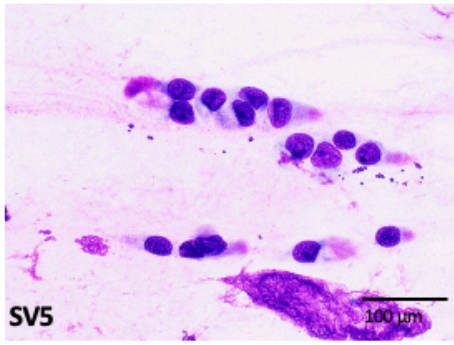
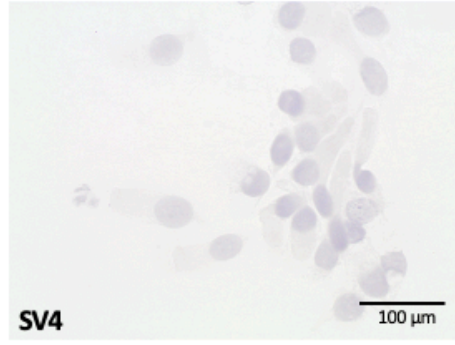
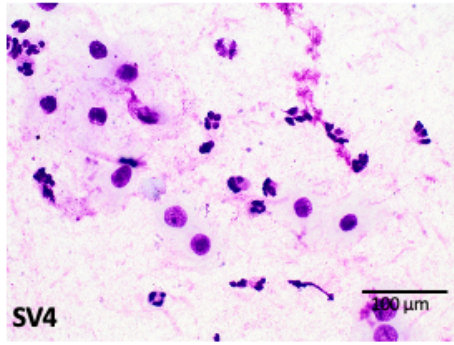
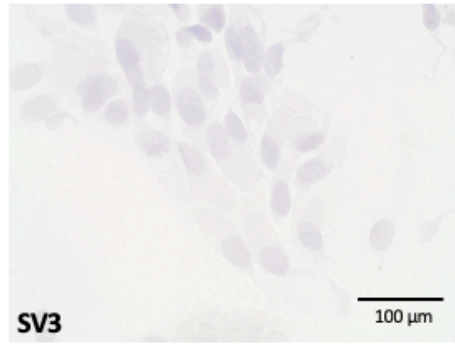
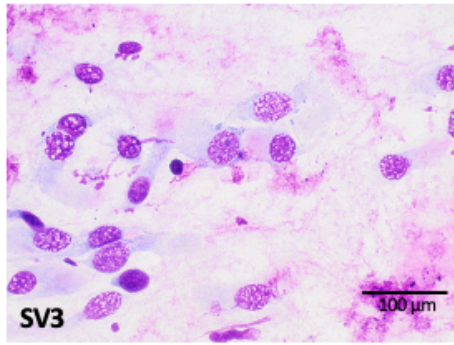
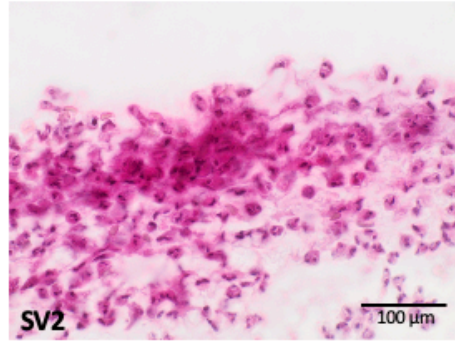
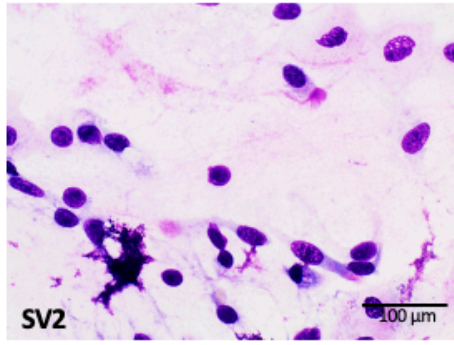
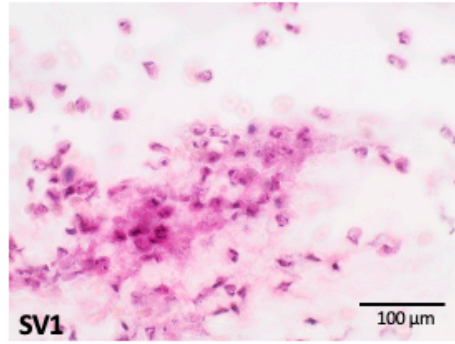
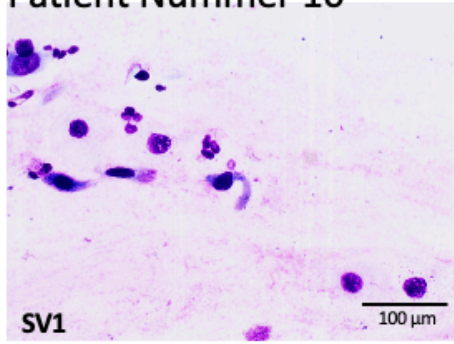
Patient Nummer 8



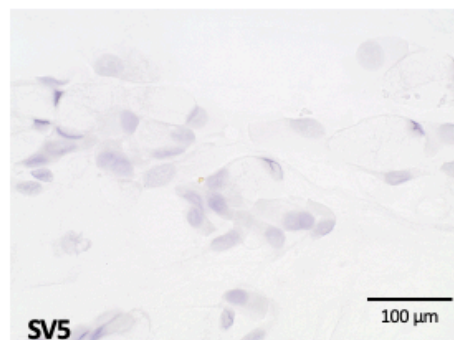
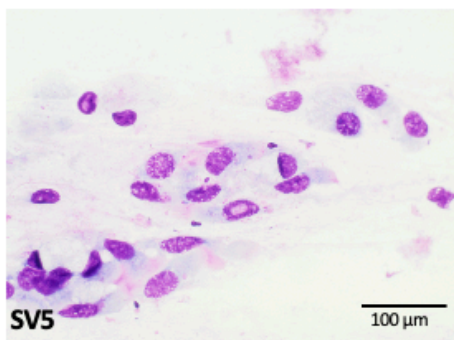
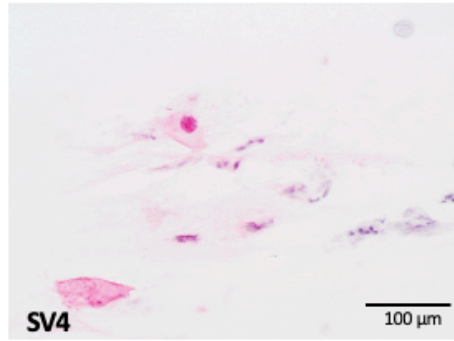
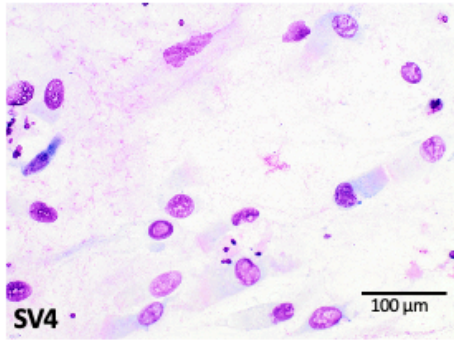
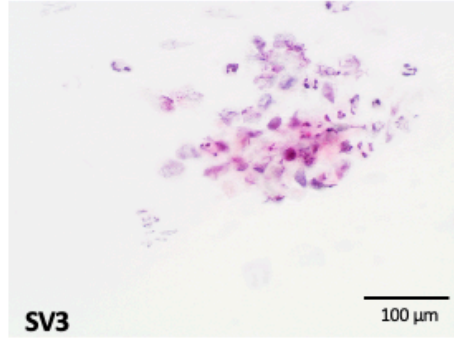
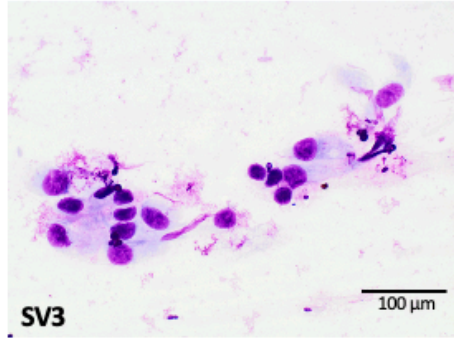
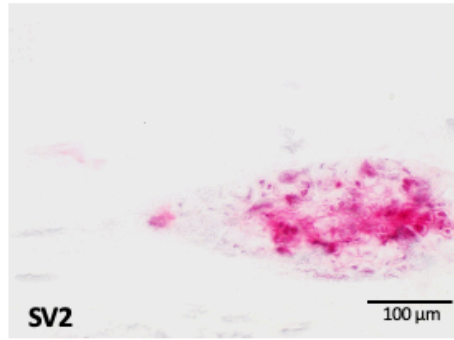
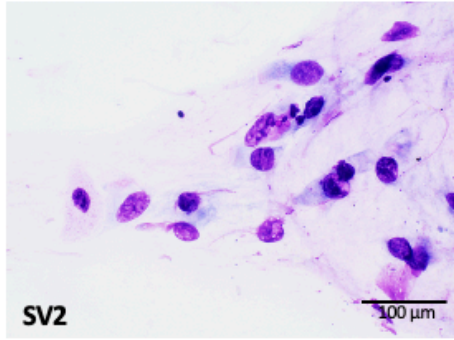
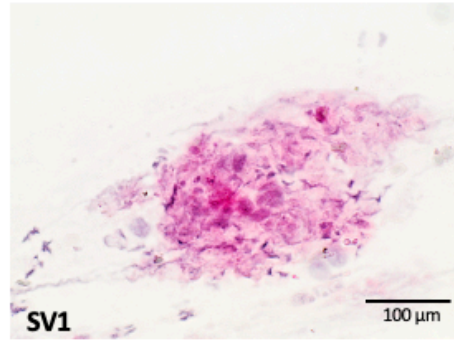
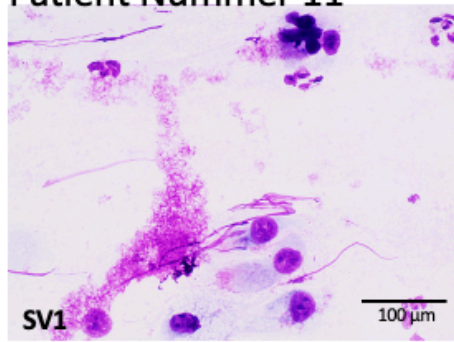
Patient Nummer 9



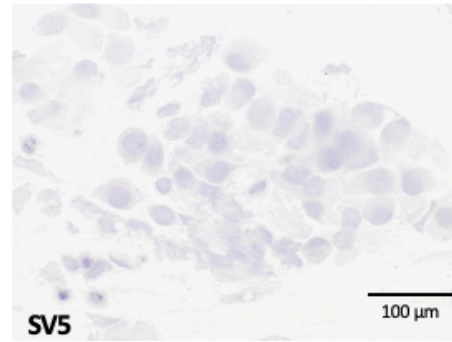
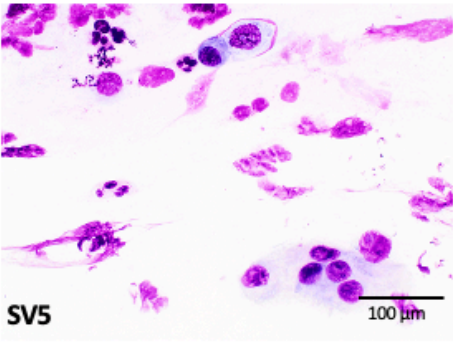
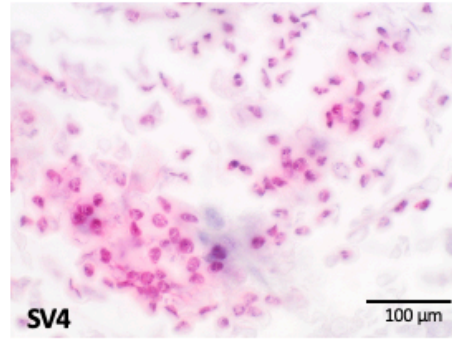
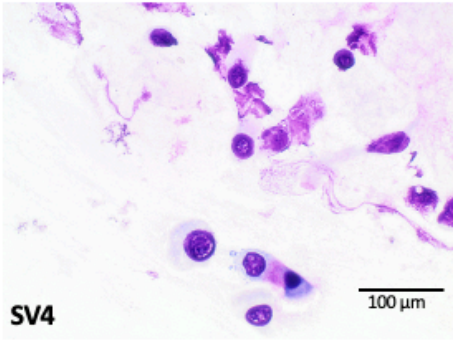
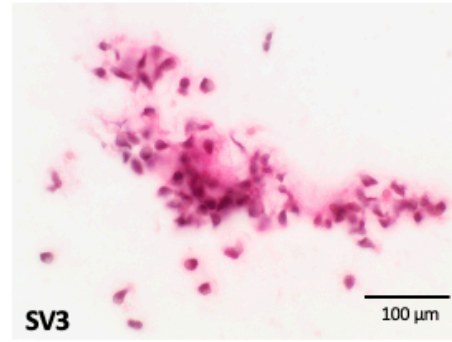
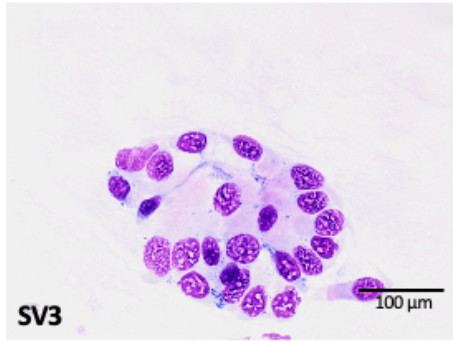
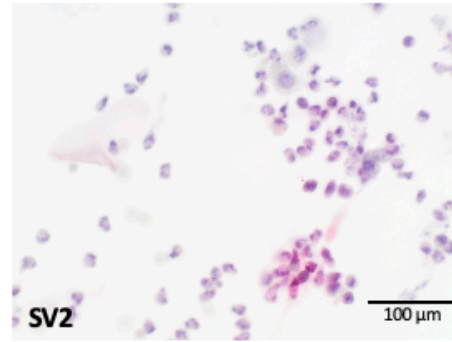
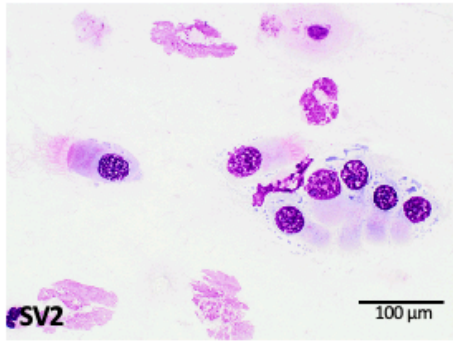
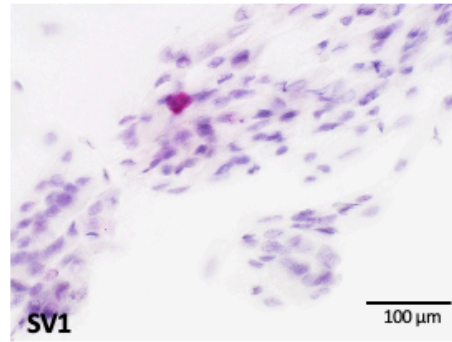
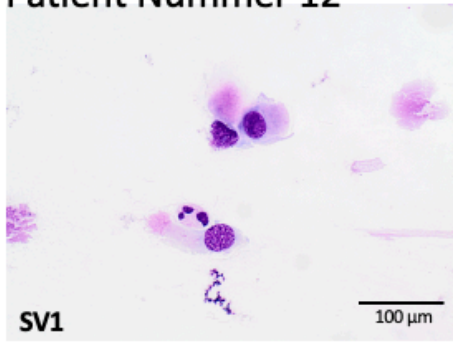
Patient Nummer 10



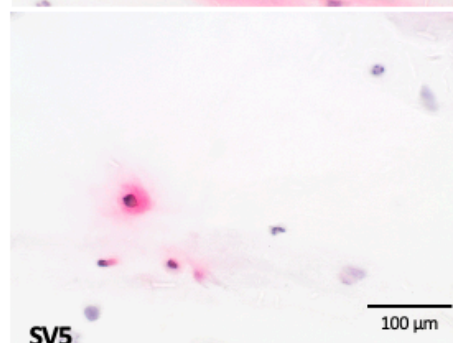
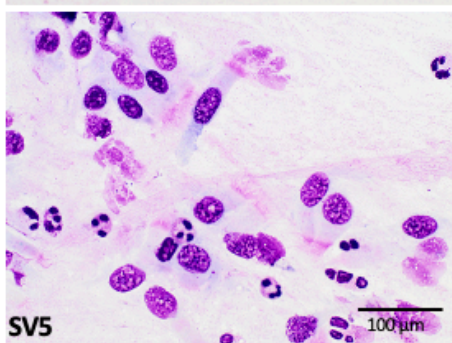
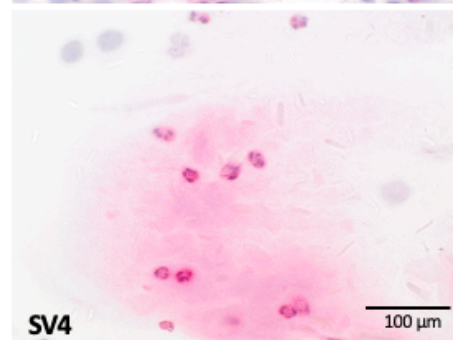
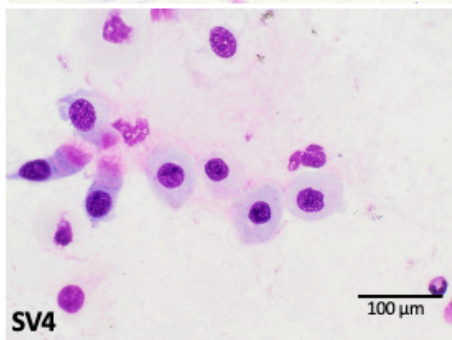
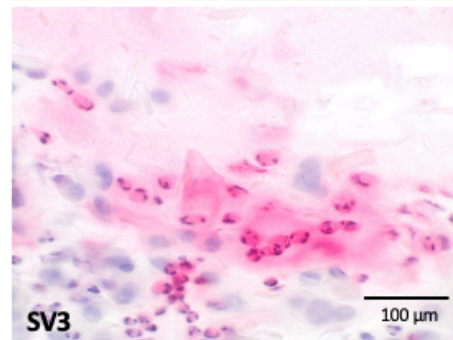
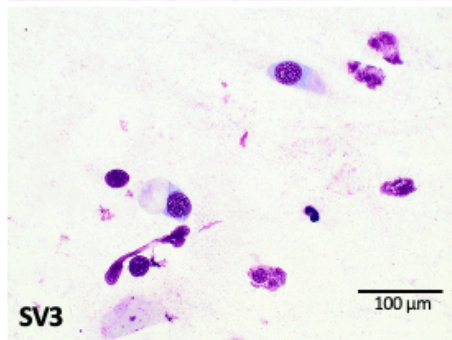
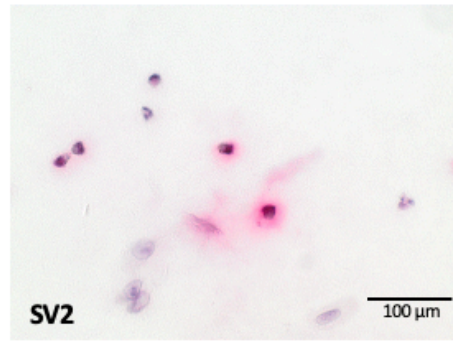
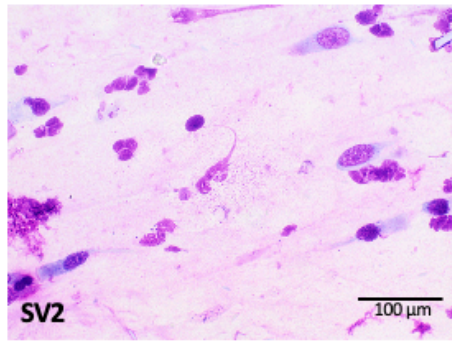
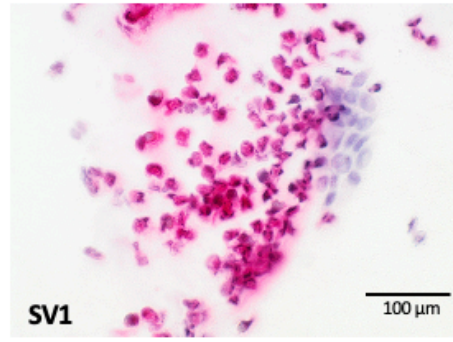
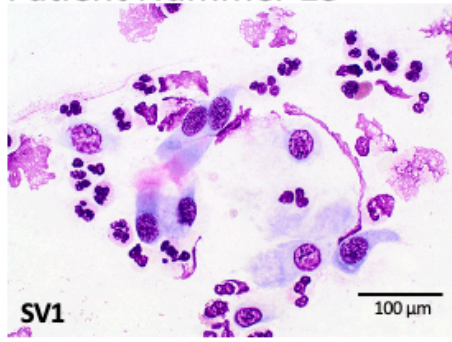
Patient Nummer 11



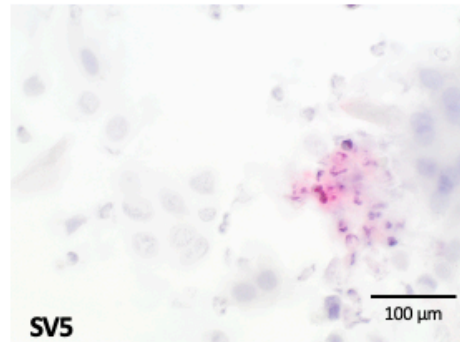
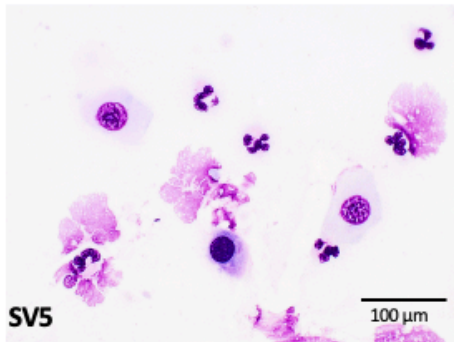
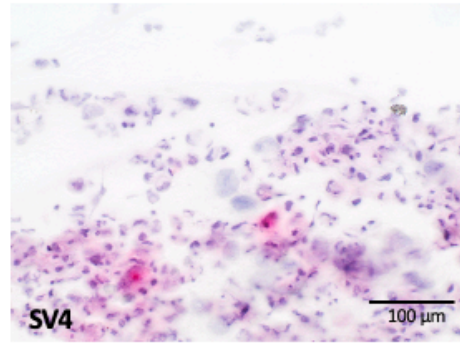
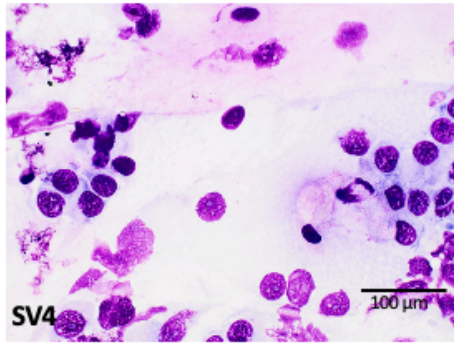
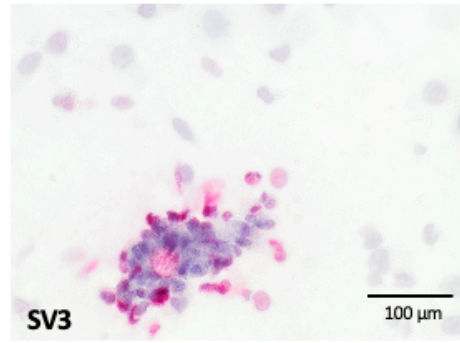
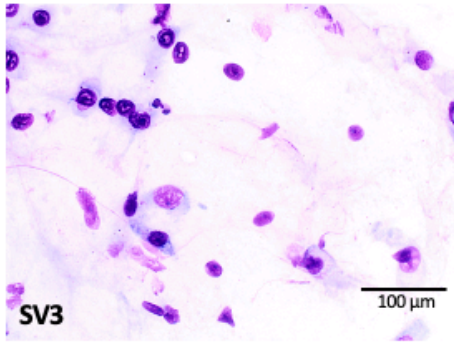
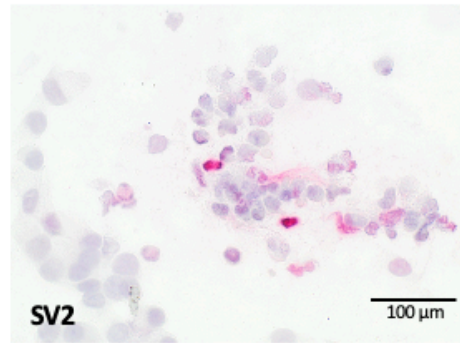
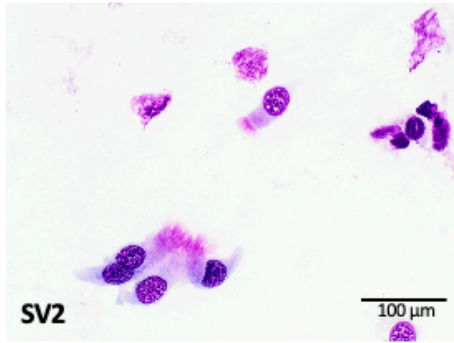
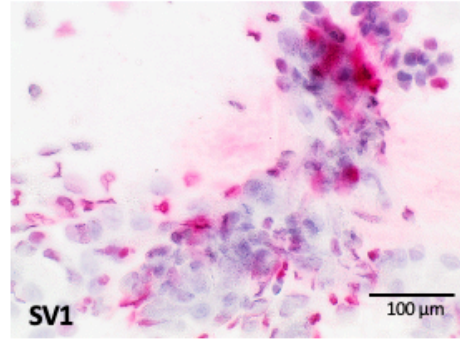
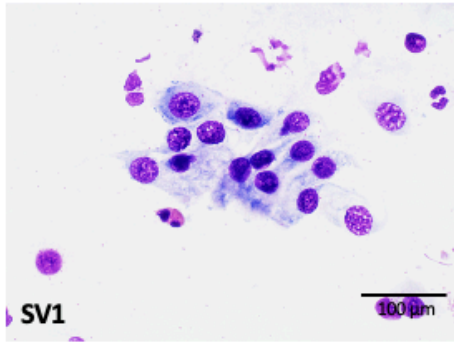
Patient Nummer 12



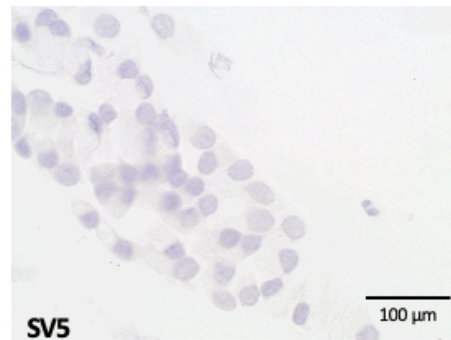
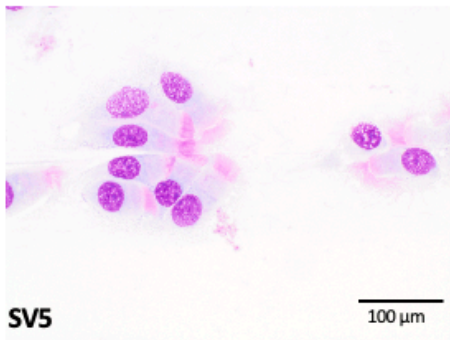
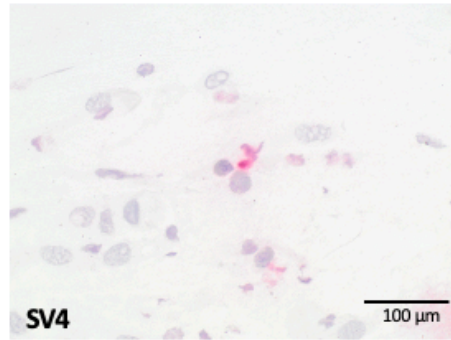
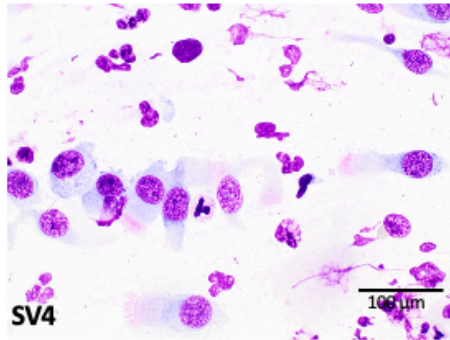
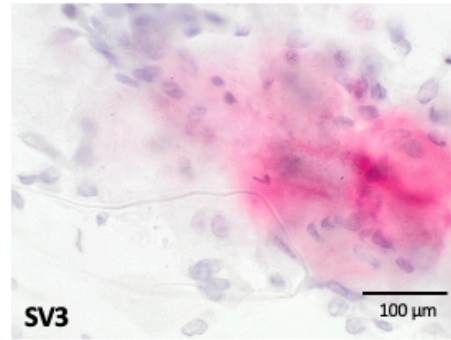
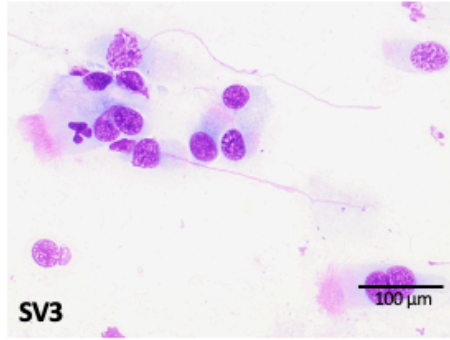
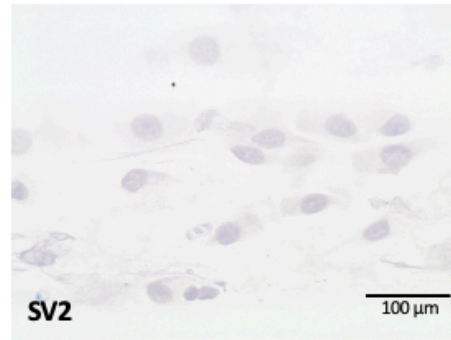
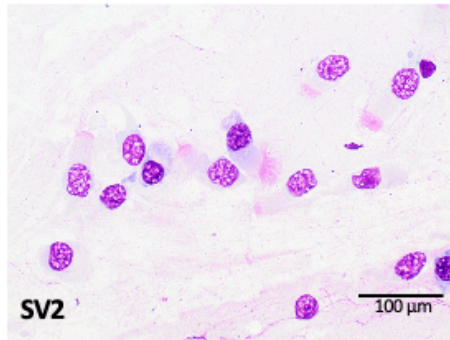
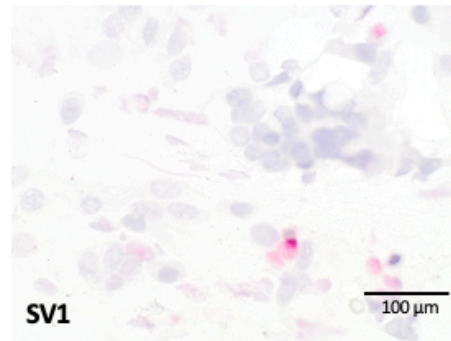
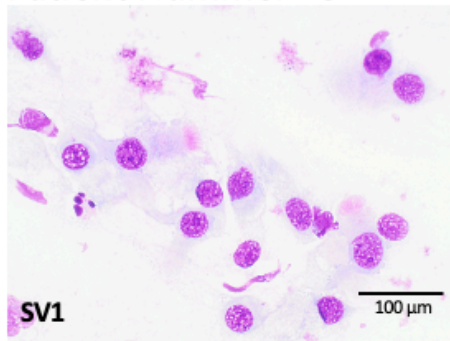
Patient Nummer 13



Patient Nummer 14

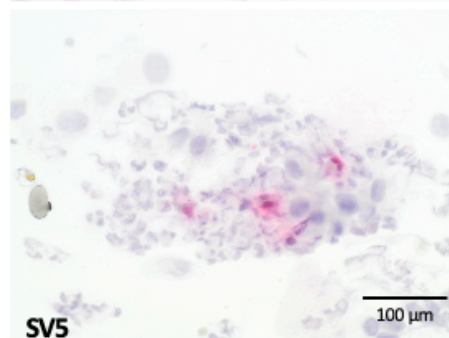
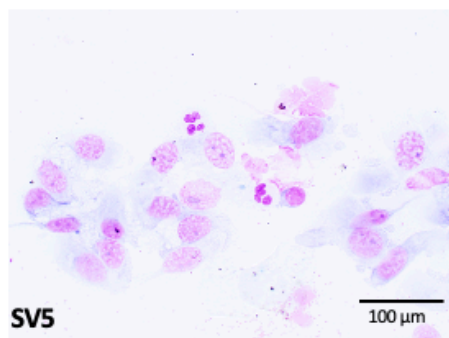
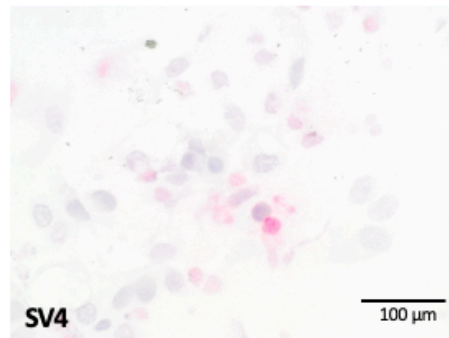
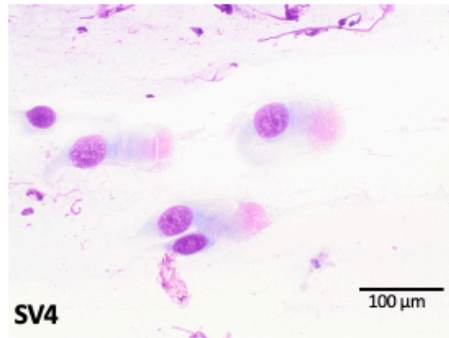
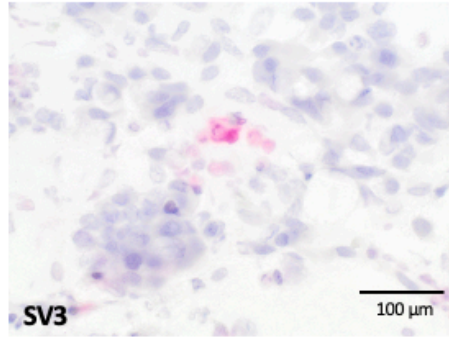
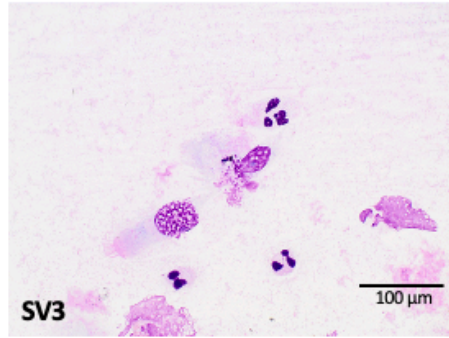
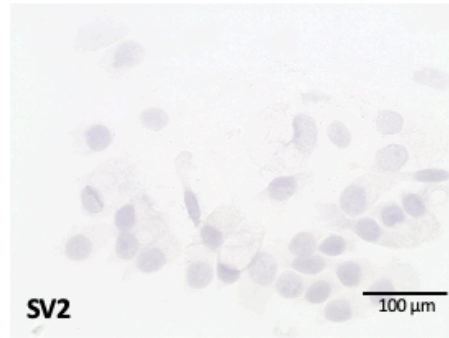
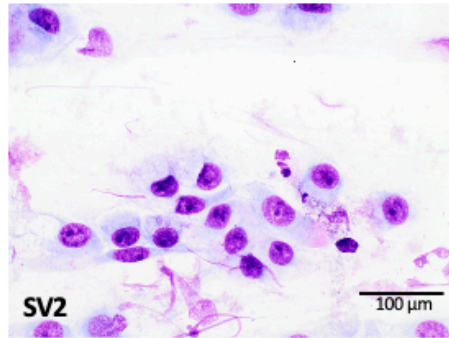
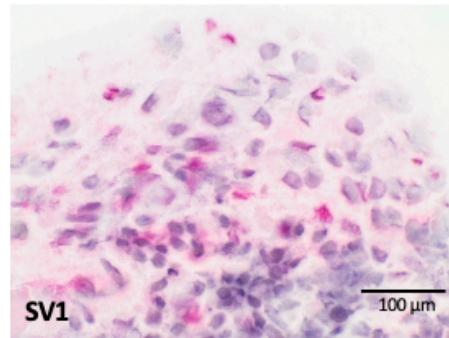
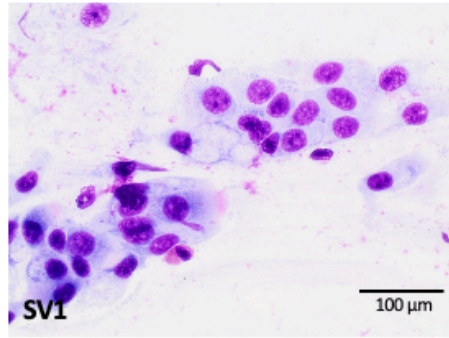


Patient Nummer 15

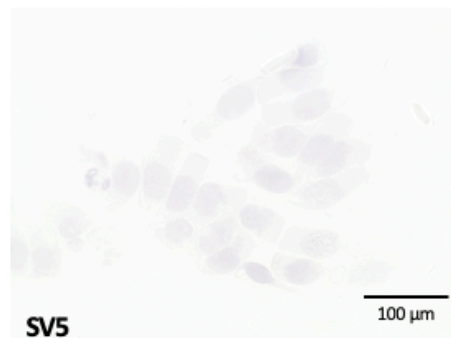
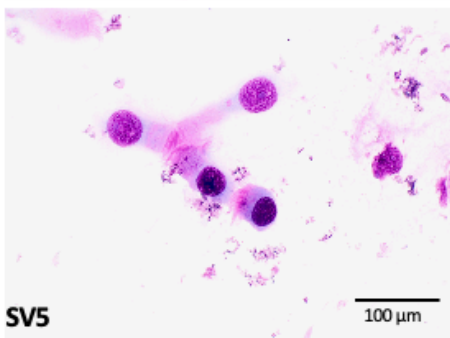
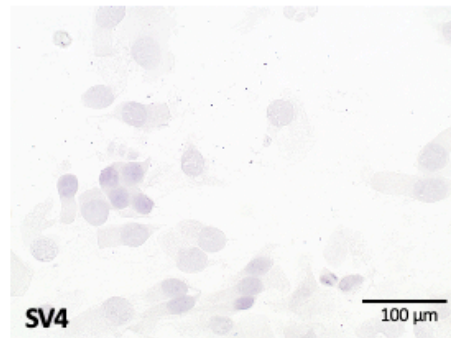
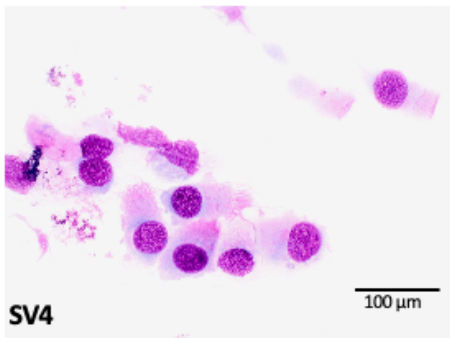
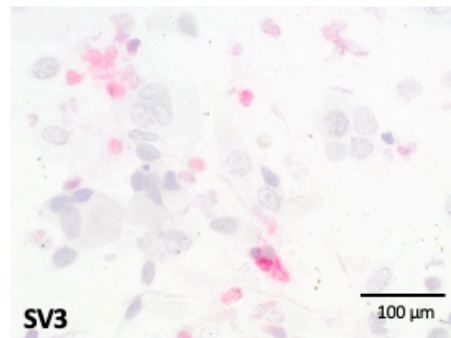
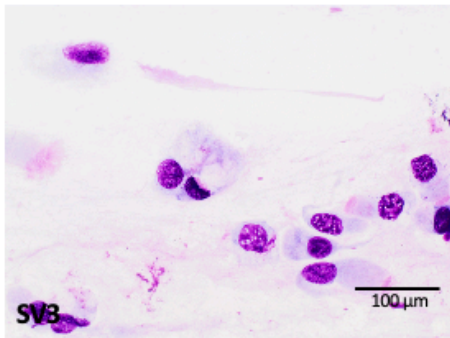
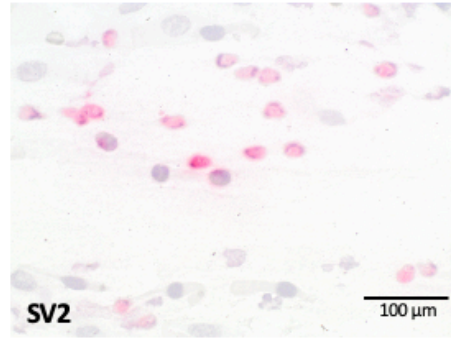
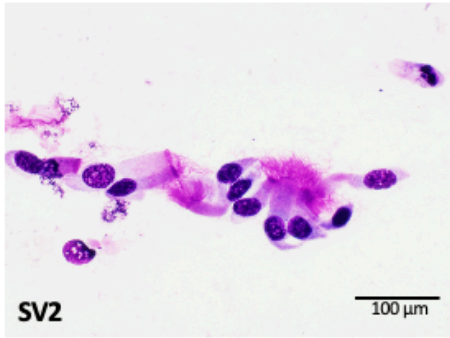
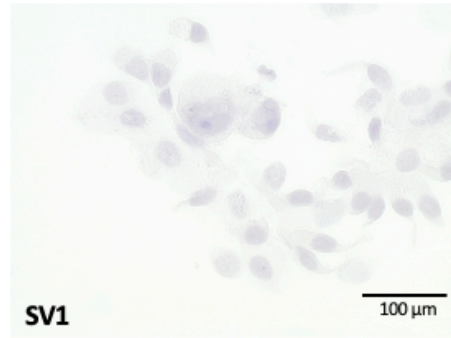
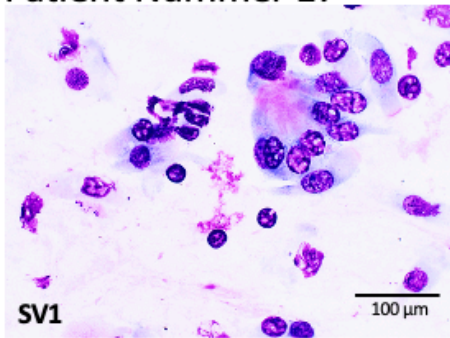




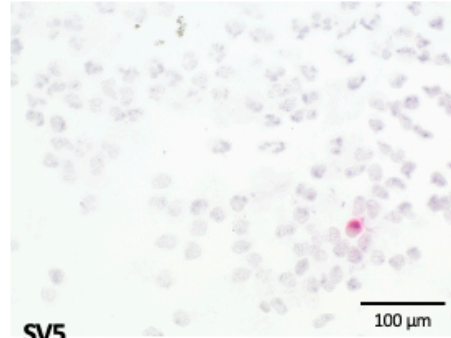
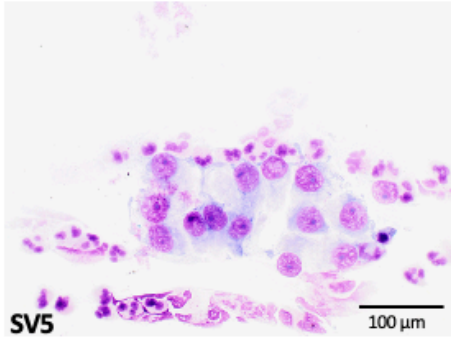
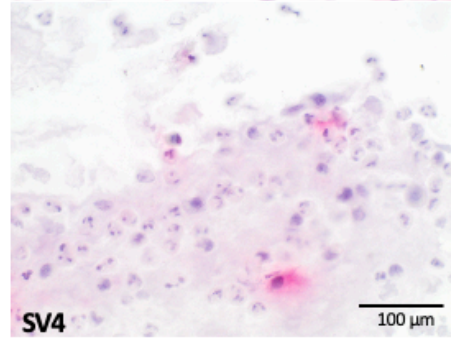
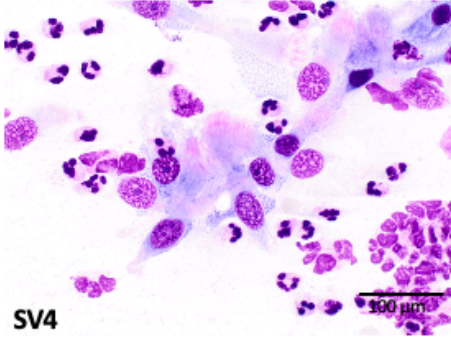
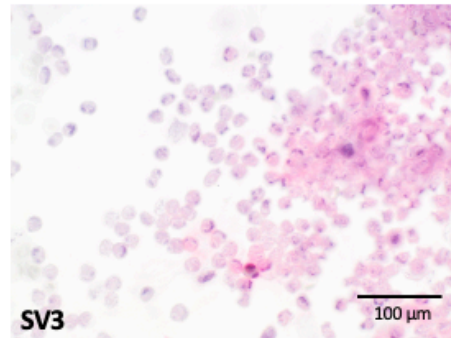
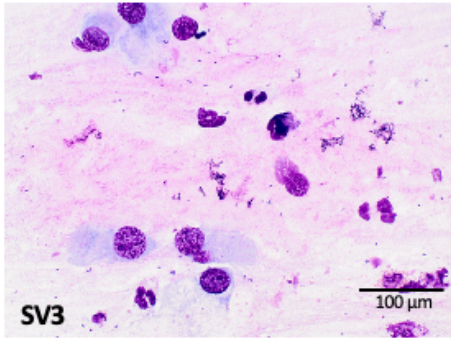
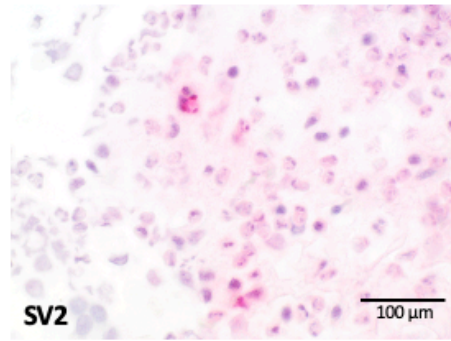
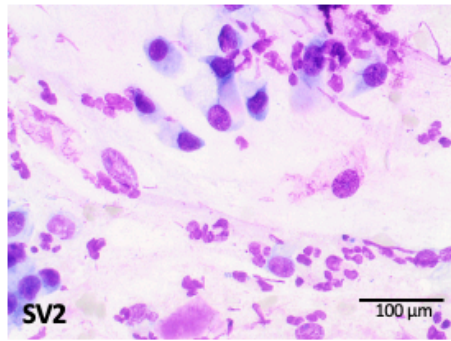
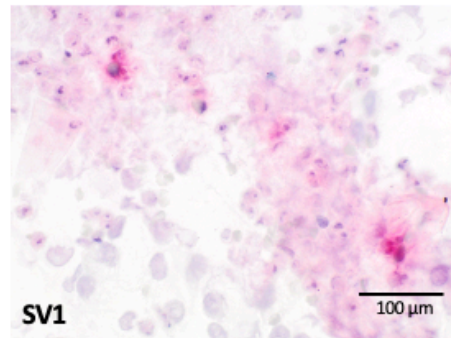
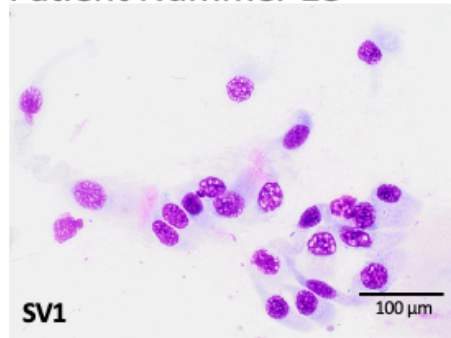
Patient Nummer 16



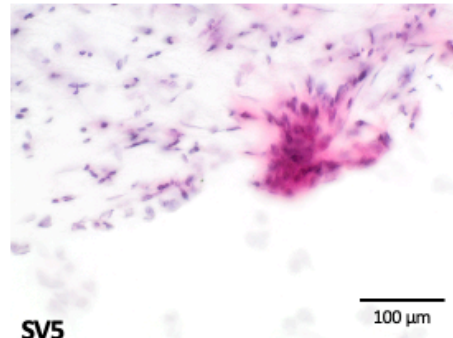
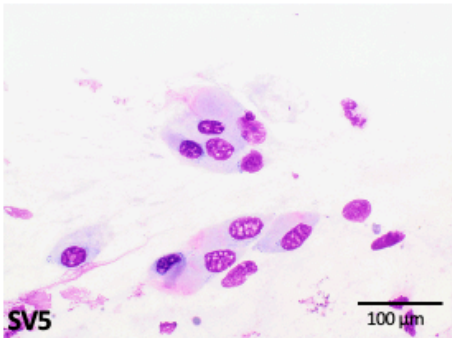
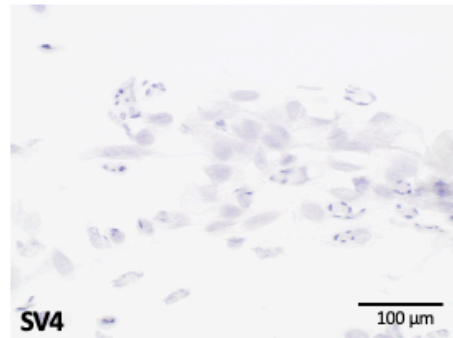
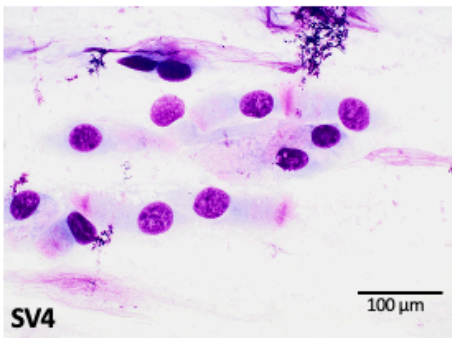
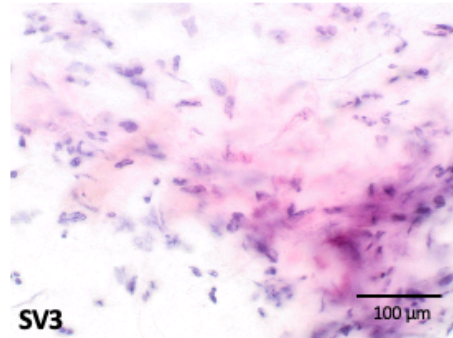
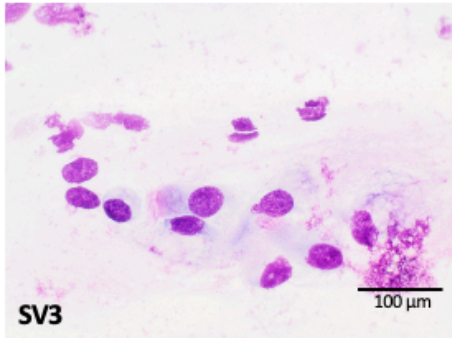
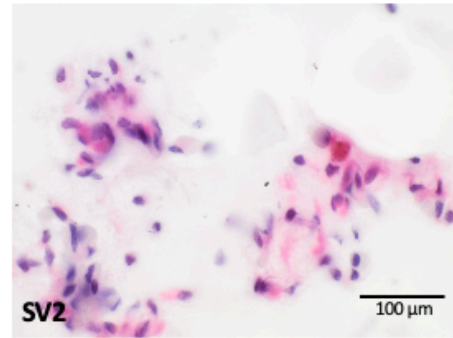
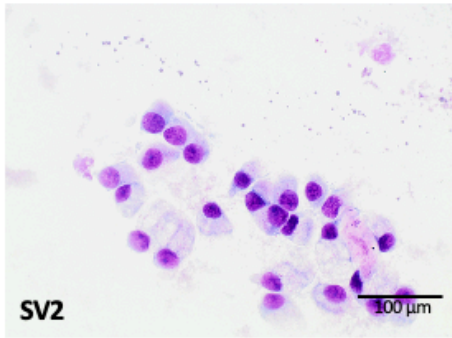
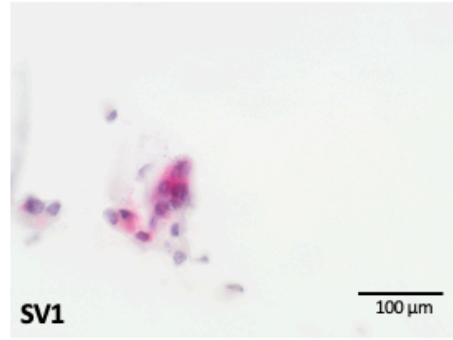
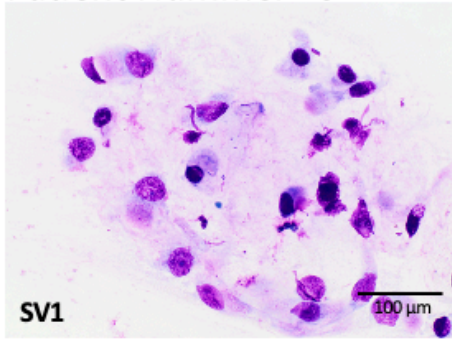
Patient Nummer 17



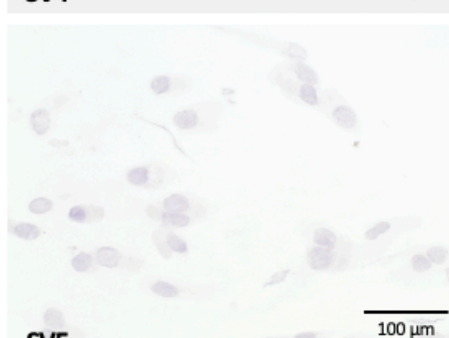
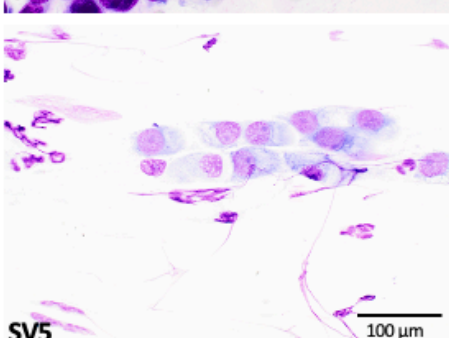
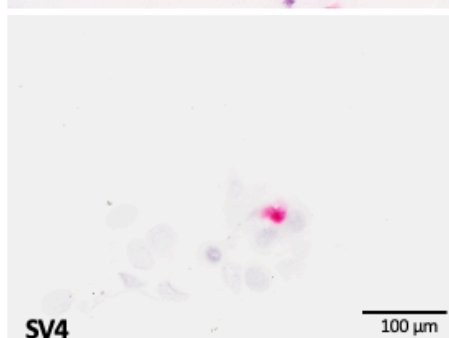
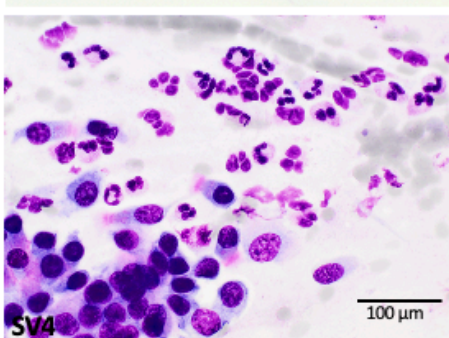
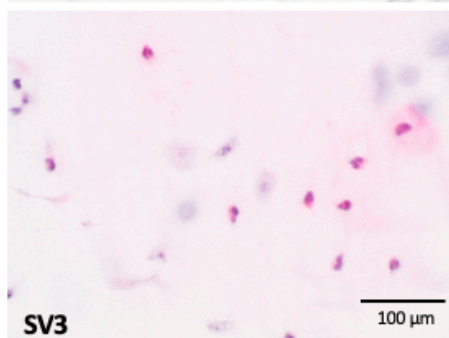
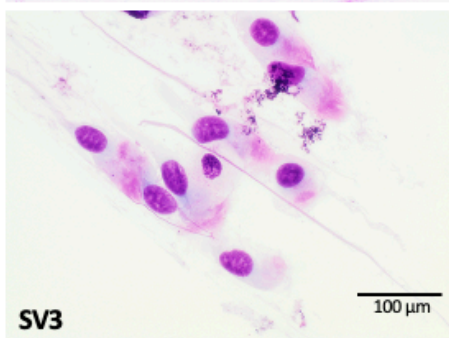
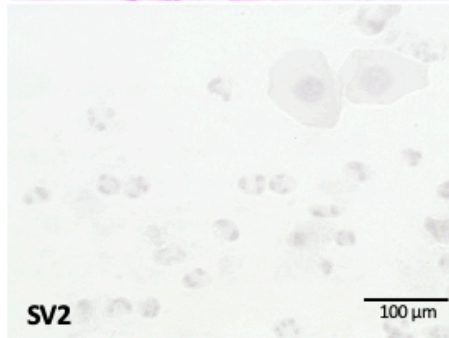
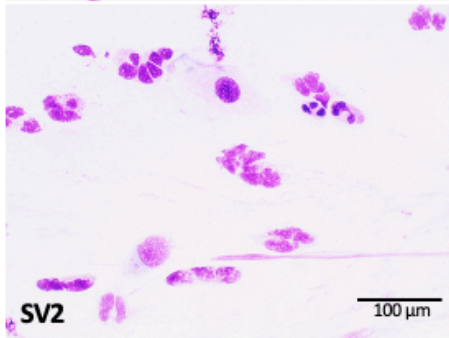
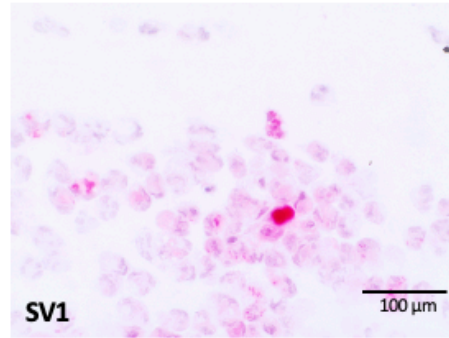
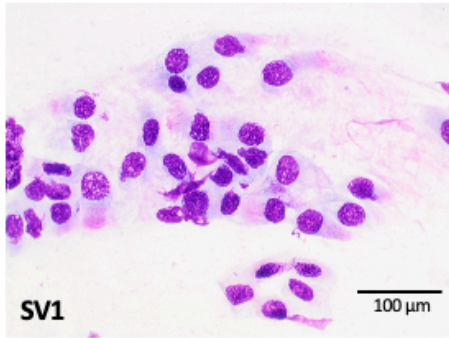
Patient Nummer 18



Patient Nummer 19



Patient Nummer 20



Bei Interesse kann unter folgendem QR-Code auf weitere MGG- und ICC-Bilder zugegriffen werden:

