

## Alerjik rinitli hastalarda serum ve nazal eozinofilik katyonik proteinin immünoterapi etkinliğinin değerlendirilmesindeki rolü

The use of serum and nasal eosinophilic cationic protein in the evaluation of the effectiveness of immunotherapy in patients with allergic rhinitis

Dr. Rauf TAHAMİLER, Dr. Murat YENER, Dr. Salih ÇANAKÇIOĞLU

**Amaç:** Ev tozu akarlarına duyarlı olan alerjik rinit hastalarında spesifik immünoterapinin (SİT) klinik etkinliğinin bir göstergesi olarak eozinofilik katyonik proteinin (EKP) rolü ve değeri araştırıldı.

**Hastalar ve Yöntemler:** Çalışmaya sürekli alerjik riniti olan 49 hasta (20 erkek, 29 kadın; ort. yaş 34.2; dağılım 16-66) alındı. Hasta grubuna gerekli spesifik immünoterapi uygulandı. Spesifik immünoterapi öncesinde, altıncı ayda ve tedavi bitiminden iki yıl sonra ölçülen nazal sekresyon ve serumdaki EKP seviyeleri hasta grubu içinde ve sağlıklı bireylerden oluşan 16 kişilik (10 erkek, 6 kadın; ort. yaş 23; dağılım 17-26) kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Hasta grubunda SİT öncesi nazal EKP seviyeleri tedavi sonrası seviyelere oranla anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). Tedavi öncesinde hasta ve kontrol grupları arasında nazal EKP açısından anlamlı fark vardı ( $p<0.05$ ). Serum EKP seviyeleri hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık göstermedi ( $p>0.05$ ); ancak hasta grubunda EKP seviyeleri tedaviyle düşme eğilimindeydi.

**Sonuç:** Alerjik rinitin takibi ve uygulanan tedavinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla hastaların semptomları ve klinik bulgularının yanı sıra nazal EKP ölçümünün güvenilir ve uygun bir laboratuvar yöntemi olduğu kanısındayız.

**Anahtar Sözcükler:** Eozinofil katyonik protein; immünizasyon; rinit, alerjik, perennial.

**Objectives:** We investigated the use of eosinophilic cationic protein (ECP) as an indicator of clinical efficiency of specific immunotherapy (SIT) in patients with allergic rhinitis sensitive to house dust mites.

**Patients and Methods:** Specific immunotherapy was administered to 49 patients (20 males, 29 females; mean age 34.2 years; range 16 to 66 years) with perennial allergic rhinitis. Nasal secretion and serum ECP levels were measured before, at the 6th month of, and two years after completion of, treatment. Comparisons were made within the patient group and with a control group of 16 healthy subjects (10 males, 6 females; mean age 23 years; range 17 to 26 years).

**Results:** Pretreatment nasal ECP levels were significantly higher than those found after the treatment ( $p<0.001$ ). Nasal ECP levels measured before SIT were significantly different from those of the control group ( $p<0.05$ ). However, serum ECP levels did not differ significantly between the two groups ( $p>0.05$ ). Serum ECP levels in the patient group tended to decrease with treatment ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** We conclude that, in addition to the symptoms and clinical findings, nasal ECP measurement may be a reliable and suitable laboratory method to monitor and evaluate the effectiveness of treatment.

**Key Words:** Eosinophil cationic protein; immunization; rhinitis, allergic, perennial.

♦ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı (Department of Otolaryngology, Cerrahpaşa Medicine Faculty of İstanbul University), İstanbul, Turkey.

♦ Dergiye geliş tarihi - 1 Haziran 2005 (Received - June 1, 2005). Düzeltme isteği - 25 Ekim 2005 (Request for revision - October 25, 2005). Yayın için kabul tarihi - 27 Ocak 2006 (Accepted for publication - January 27, 2006).

♦ İletişim adresi (Correspondence): Dr. Rauf Tahamiler. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, 34303 İstanbul, Turkey. Tel: +90 216 - 410 77 99 Faks (Fax): +90 216 - 384 77 48 e-posta (e-mail): tahamiler@isbank.net.tr

Eozinofillerin 1879 yılında Erlich tarafından tanımlanmasından beri enflamatuvar olaylarda oynadığı rol ilgi uyandırmıştır. Bilindiği üzere eozinofiller parazitik enfeksiyonlarda konakçı cevabını yaratan majör hücrelerdir. Eozinofiller ayrıca içerdiği eozinofilik katyonik protein (EKP), majör temel protein (MTP) ve diğer granüller sayesinde astım,<sup>[1]</sup> atopik dermatit,<sup>[2]</sup> bazı alerjik göz hastalıkları ve rinitte<sup>[3]</sup> enflamatuvar reaksiyonlar oluşturur. Bu proteinler arasında yer alan EKP enflamasyonun potent bir etkileyicisi, bazı hücrelere karşı potansiyel bir toksin ve çeşitli alerjik hastalıkların aktivitesinde önemli bir proteindir.<sup>[4,5]</sup> Günümüzde hücrelerin üzerlerindeki bazı özel işaretlerin çeşitli hastalıkların patofizyolojisi ve tedaviye vereceği cevabı yansıttığı bilinmektedir. Eozinofilik katyonik protein alerjik hastalıklara yapılan tedavilerin etkisini tespit etmekte kullanılabilen enflamatuvar bir markırdır. Bu çalışmada sağlıklı kişilerde ve alerjik rinitli hastalarda spesifik immünoterapi (SİT) öncesi, immünoterapi sırasında ve tedavi sonrasında nazal sekresyon ve serumda EKP seviyelerini ölçerek yapılan tedavinin etkinliğini ölçmek amaçlandı. Eozinofilik katyonik proteinin alerjik rinitin takibindeki önemi ve ev tozu akarlarına duyarlı olan alerjik rinit hastalarında spesifik immünoterapinin klinik etkinliğinin bir göstergesi olarak rolü tartışıldı.

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

Polikliniğimize başvuran hastalardan öykü ve nazal endoskopik muayene bulguları alerjik rinite uyanlara ALK - Abello (Danimarka) tarafından üretilen 24 alerjen, histamin ve negatif kontrol içeren prick test paneli uygulandı. Sadece *Dermatophagoides pteronyssinus ve farinae*'ya karşı 5 mm'den ve negatif kontrolden daha fazla endürasyon gösterenlere spesifik IgE tayini ve bazılarında nazal provokasyon yapılarak SİT uygulanacak hastalar seçildi ve hasta grubu olarak çalışmaya alındı. Spesifik immünoterapi için ALK-Abello'nun ürettiği standardize, pütürifiye %50/%50 D.p. ve D.f. ekstraktı içeren başlangıç ve idame setleri kullanıldı. Aşılama ilk altı ay için her hafta uygulanarak idame dozuna ulaşıldı ve iki-üç yıl boyunca aylık idame aşı uygulaması yapıldı. Spesifik immünoterapi tedavisi bitiminden iki yıl sonra alerjik rinit ile ilgili yakınması olmayanlar ve muayene bulguları normal olanlar hasta grubuna alındı. Kliniğimizde rutin olarak SİT uygulanan hastalara tedavi öncesi ve sonrası EKP ölçümleri yapılmaktadır. Çalışmaya alınan kişiler 1998-2000 yılları

arasında SİT tedavisi gören hastalar arasından seçildi. Kontrol grubu bireyleri de aynı dönemde çalışmaya alınarak tetkik edildi. Çalışmanın etik açıdan uygunluğunun incelenmesi için fakültemiz etik kuruluna başvuruldu.

Çalışmaya 49 sürekli alerjik rinitli hasta (20 erkek, 29 kadın; ort. yaş 34.2; dağılım 16-66) ve kontrol grubu olarak 16 sağlıklı birey (10 erkek, 6 kadın; ort. yaş 23; dağılım 17-26) alındı. Alerjik rinitli hastaların nazal sekresyonlarında ve serumlarında EKP düzeyi SİT öncesi, SİT'nin altıncı ayında ve SİT bitiminden iki yıl sonra ölçümler yapıldı. Hiçbir alerjik rinit semptomu, muayene bulgusu olmayan ve alerji testleri negatif olan sağlıklı kişilerin de nazal sekresyonlarında ve serumda EKP düzeyleri ölçülerek kontrol grubu verileri oluşturuldu. Nazal sekresyon 50 ml serum fizyolojikle iki kez lavaj yapılarak alındı ve alınan sıvı 10 dakika boyunca 1000 devirde sentrifüje edildi, ayrıca her hastadan 5 ml venöz kan alınarak serum elde etmek üzere sentrifüje edildi. Yıkama suları ve serum ölçümler yapıncaya kadar -25 °C'de saklandı. Eozinofilik katyonik protein ölçümleri fluoroenzim immünoassay yöntemini kullanan Unicap EKP Assay kitiyle yapıldı (Pharmacia and Upjohn, Uppsala, Sweden). İmmüno CAP ile kovalent bağlı olan anti-EKP'nin hasta serumundaki EKP ile reaksiyona girmesi planlanarak yıkamadan sonra enzimle işaretli anti-EKP antikolar ortama konuldu. İnkübasyondan sonra bağlanmamış enzim-anti-EKP yıkandı ve bağlı kompleks gelişen ajanla inkübe edildi. Reaksiyonu durdurduktan sonra, serumdaki EKP konsantrasyonuyla orantılı olarak ortaya çıkan floresans ölçüldü. Ölçülen nazal ve serum EKP seviyeleri, kontrol grubu ve hasta grubu arasında ve hasta grubunda tekrarlanan ölçümler arasında istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirildi.

İstatistiksel olarak sonuçlara önce tek yönlü varyans analizi uygulandı. Çalışma gruplarının kendi sonuçları için Bonferoni testi, kontrol ve çalışma gruplarının sonuçlarının karşılaştırılması için Dunnett testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak alındı.

## BULGULAR

Spesifik immünoterapi tedavisi öncesi hasta grubunda nazal EKP seviyeleri 13.4 ile 1.8 ng/mL (ort. 7.1±3.1 ng/mL) arasında değişiyordu ve serum EKP seviyeleri 12.7 ile 5.2 ng/mL (ort. 9.7±2.2) arasındaydı. Altıncı aydaki nazal EKP seviyeleri 19.6 ve 1.7

ng/mL (ort. 4.64±4.6 ng/mL) arasında, serum EKP düzeyleri 18.5 ile 2.4 ng/mL (ort. 9.68±3.8 ng/mL) arasında değişiyordu. Tedavi bitiminden iki yıl sonra nazal EKP seviyeleri 7.2 ve 1.6 ng/mL (ort. 2.27±1.3 ng/mL) arasında, serum EKP düzeyleri 16.6 ve 2.7 ng/mL (ort. 8.84±4.2 ng/mL) arasında idi. Kontrol grubu nazal EKP seviyeleri 16.4 ile 1.7 ng/mL (ort. 3.75±3.7) ve serum EKP seviyeleri 24.9 ve 2.4 ng/mL (ort. 11.2±7.1) arasındaydı.

Hasta grubunda tekrarlanan ölçümlerde nazal EKP seviyelerinde anlamlı fark saptandı (Tablo 1, p<0.05). Hasta grubunda SİT öncesi nazal EKP seviyeleri tedavi sonu nazal EKP seviyelerine oranla anlamlı derecede yüksekti (Tablo 1, p<0.001). Spesifik immünoterapi öncesi hasta ve kontrol grubu arasında nazal EKP seviyeleri açısından hasta grubu sonuçları lehinde anlamlı fark vardı (Tablo 1, p<0.05). Gruplar arasında serum EKP düzeyleri arasında anlamlı fark bulamamıza karşın seviyelerin tedavi ile düştüğü gözlemlendi (Tablo 1, p>0.05). Bu bulgular Tablo 1’de gösterilmiştir.

### TARTIŞMA

Vücudun herhangi bir yerinde alerjik reaksiyon oluşturabilecek bir ajan varlığında çeşitli spesifik ve non-spesifik immün cevaplar ortaya çıkar. Genel olarak enflamasyon immün reaksiyonun ana parçasıdır. Çeşitli çalışmalar enflamatuvar hücre olarak eozinofillerin üst hava yolları ve alt hava yollarının alerjik hastalıklarındaki rollerini ortaya koymuştur. Eozinofiller parazitik enfeksiyonların yanı sıra astım, atopik dermatit, alerjik rinit, alerjik konjonktivit ve otoimmün rahatsızlıklarda aktive olur ve tutulan dokuda epitele zarar verici proteinler salgılar.

Alerjik ve non-alerjik rinitlerde eozinofil enflamasyonu önemli bir olaydır. Çeşitli ajanların etkisiyle eozinofiller granüllerinden toksik maddeleri sal-

gularlar ve nazal mukozada özel bazı olayları başlatır. Olgun eozinofillerin çoğu interstisyel dokularda bulunur ve sadece %1’den azı dolaşımdadır. Eozinofil granülleri dört çeşit protein içerir; majör temel protein, eozinofil peroksidaz (EPO), eozinofil derivate nörotoksin (EDN) ve eozinofil katyonik protein.<sup>[1-3,6-9]</sup>

Eozinofilik katyonik protein, eozinofil kaynaklı enflamatuvar hastalıkların aktivitesinin takibinde kullanılan önemli bir parametre olarak bildirilmektedir. Çoğu vücut sıvısında, eozinofilin spesifik markırı olarak EKP seviyesini ölçen duyarlı immün cevap ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Astım ya da alejik rinit gibi spesifik hastalıklarda EKP seviyesi kan, nazal sekresyon ve akciğer lavaj sıvısında ölçülebilir. Bazı yazarlar tarafından gösterildiği gibi astım hastalarında periferik kandaki eozinofil miktarı ile EKP seviyesi uyumludur.<sup>[10]</sup> Bu bulgular, daha sonrasında birkaç yazarın çalışmalarıyla desteklenmiştir.<sup>[11]</sup> Enflamasyonda eozinofil varlığı ve aynı zamanda mukozadaki eozinofil aktivitesinin göstergesi olarak EKP kullanılabilir. Aynı zamanda alerjik hastalığı olanlarda, nazal lavaj ve bronkoalveoler lavajda da (BAL) EKP ve eozinofil seviyesinin yükseldiği saptanmıştır. Kan seviyesi ölçüldüğünde indirekt olarak burun ve akciğerdeki aktiviteyi yansıtır fakat lavaj sıvısı ölçüldüğünde bölgesel reaksiyonu yansıtır. Atopik dermatitli ve astımlı hastalarda EKP seviyesinin arttığını ve bunun duyarlılıkla ilişkili olduğunu gösteren verilere karşıt olarak Andersson ve ark.<sup>[12]</sup> nazal sekresyondaki EKP seviyesi ile hipersensitiviteyi uyaran nazal alerjen arasında ilişki olduğunu gösterememişlerdir.<sup>[4,5]</sup> Çalışmada kortikosteroid kullanılmış ve artmış olan cevabı ortadan kaldırmıştır, fakat nazal sekresyondaki EKP seviyesinde değişiklik saptanmamıştır. Nazal EKP’yi ilk kez ölçen Linder ve ark.<sup>[13]</sup> çalışmalarında EKP seviyesi ile hipersensitiviteyi uyaran nazal alerjen arasındaki olası ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Bu çalışmadan sonra Bisgaard ve ark.<sup>[14]</sup> nazal sekresyondaki EKP ölçümünün, alerjik hastalardaki eozinofil aktivasyonunun duyarlı bir markırı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Bascom ve ark.<sup>[15]</sup> alerjen ile uyarı sonrası nazal lavajdaki eozinofil ve eozinofil ürünlerinin arttığını saptamışlardır. Yazar, lavaj sıvısındaki yüksek EKP seviyesinin lokal üretimi gösterdiğini öne sürmüştür. Bizim çalışmamızda, kontrol grubuyla kıyaslandığında, alerjik hastaların nazal yıkama sıvısındaki EKP seviyesinin artmış olduğu görüldü. Bu bulgular EKP nazal reaktivasyonu ve lokal enflamasyon arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Rasp

TABLO I

KONTROL VE HASTA GRUPLARINDA NAZAL VE SERUM EKP DÜZEYLERİ

	Nazal EKP	Serum EKP
Kontrol grubu	3.75±3.7*	11.2±7.1
Tedavi öncesi	7.1±3.1**	9.7±2.2
Tedavinin 6. ayında	4.64±4.6	9.68±3.8
Tedaviden sonra	2.27±1.3	8.84±4.2

EKP: Eozinofilik katyonik protein; \*:Tedavi öncesi hasta grubuna kıyasla p<0.05; \*\*: Tedavi sonrasında kıyasla p<0.001.

ve ark.<sup>[16]</sup> ile Klimerk ve ark.<sup>[17]</sup> çalışmalarında, nazal sekresyondaki EKP seviyesinin, hastalığın aktivasyonu ve klinik bulgularıyla, kandaki EKP'ye göre daha iyi ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar bizim çalışmamızda olduğu gibi, serum EKP seviyesi ile hastalığın aktivitesi ve tedavi durumu arasında ilişki bulunmadığını doğrulamaktadır. Alerjik hastalıklar için uygulanabilen spesifik tedavi yöntemleri immünoterapi ve alerjenden uzak durmadır. İmmünoterapinin mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır. İmmünoterapi alerjik hastalıktaki mediyatör salınım mekanizması ve enflamatuvar değişikliklerle etkileşir, alerjik reaksiyondaki efektör hücreleri azaltır ve alerjenin uyardığı geç faz cevabını inhibe eder. Bir kaç çalışmada mite ve polene bağlı alerjik rinitli hastalara yapılan spesifik immünoterapinin etkinliğini saptamak amacıyla nazal EKP ölçümleri yapılmış. Alerjen maruziyetiyle artan nazal EKP düzeyinin, tedavi öncesi ve tedavi sonrası immünoterapiyle belirgin olarak düştüğü gösterilmiştir.<sup>[18-21]</sup> Bu bulgular bizim SİT öncesi ve sonrası elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Spesifik immünoterapi sonrası nazal EKP seviyesinde değişiklik olmasına karşın, çalışmamızdaki ölçümlerin hiçbirinde serum EKP'sinde belirgin değişiklik saptanmadı.

Ohashi ve ark.<sup>[22]</sup> serum EKP seviyesinin ancak immünoterapiden iki yıl sonra belirgin olarak azaldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda serum EKP düzeyi immünoterapiden iki yıl sonra ölçüldü ve serum EKP seviyesinde değişiklik saptanmadı. Türk tıp literatürüne bakıldığında immünoterapinin tedavideki etkinliğinin nazal EKP ölçümüyle araştırıldığı herhangi bir makaleye rastlanmadı. Sadece Tutluoğlu ve ark.<sup>[8]</sup> heparin ve izotonik serum fizyolojisinin etkisini belirlemek amacıyla nazal lavajda EKP ölçümü yöntemini kullanmışlardır.

Sonuç olarak, alerjik rinitin takibi ve uygulanan tedavinin etkinliğini saptamak amacıyla, hastaların semptomları ve klinik bulgularının, yanı sıra nazal EKP ölçümünün güvenilir ve uygun bir laboratuvar yöntemi olduğu kanısındayız.

#### KAYNAKLAR

1. Elberling J, Linneberg A, Dirksen A, Johansen JD, Frolund L, Madsen F, et al. Mucosal symptoms elicited by fragrance products in a population-based sample in relation to atopy and bronchial hyper-reactivity. *Clin Exp Allergy* 2005;35:75-81.
2. Lee CH, Chuang HY, Shih CC, Jee SH, Wang LF, Chiu HC, et al. Correlation of serum total IgE, eosinophil

- granule cationic proteins, sensitized allergens and family aggregation in atopic dermatitis patients with or without rhinitis. *J Dermatol* 2004;31:784-93.
3. Woerly G, Loiseau S, Loyens M, Schoch C, Capron M. Inhibitory effects of ketotifen on eotaxin-dependent activation of eosinophils: consequences for allergic eye diseases. *Allergy* 2003;58:397-406.
4. Czech W, Krutmann J, Schopf E, Kapp A. Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 1992;126:351-5.
5. Ferguson AC, Vaughan R, Brown H, Curtis C. Evaluation of serum eosinophilic cationic protein as a marker of disease activity in chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95(1 Pt 1):23-8.
6. Venge P. Monitoring the allergic inflammation. *Allergy* 2004;59:26-32.
7. Bez C, Schubert R, Kopp M, Ersfeld Y, Rosewich M, Kuehr J, et al. Effect of anti-immunoglobulin E on nasal inflammation in patients with seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1079-85.
8. Tutluoğlu B, Gemicioğlu B, Yılmaz N, Küçükusta AR, Kılınç Yılmaz G, Yaman M. Hafif astim ve rinitli olgularda nazal lavaj sıvısı eozinofilik katyonik protein ve triptaz değerlerine heparin ve izotonik sodyum klorürün etkisi. *Solunum Dergisi* 2000;2:36-41.
9. Juhlin L, Venge P. Eosinophilic cationic protein (ECP) in skin disorders. *Acta Derm Venereol* 1991;71:495-501.
10. Frigas E, Gleich GJ. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:527-37.
11. Marcucci F, Sensi LG, Migali E, Coniglio G. Eosinophil cationic protein and specific IgE in serum and nasal mucosa of patients with grass-pollen-allergic rhinitis and asthma. *Allergy* 2001;56:231-6.
12. Andersson M, Andersson P, Venge P, Pipkorn U. Eosinophils and eosinophil cationic protein in nasal lavages in allergen-induced hyperresponsiveness: effects of topical glucocorticosteroid treatment. *Allergy* 1989;44:342-8.
13. Linder A, Venge P, Deuschl H. Eosinophil cationic protein and myeloperoxidase in nasal secretion as markers of inflammation in allergic rhinitis. *Allergy* 1987;42:583-90.
14. Bisgaard H, Gronborg H, Mygind N, Dahl R, Lindqvist N, Venge P. Allergen-induced increase of eosinophil cationic protein in nasal lavage fluid: effect of the glucocorticoid budesonide. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:891-5.
15. Bascom R, Pipkorn U, Proud D, Dunnette S, Gleich GJ, Lichtenstein LM, et al. Major basic protein and eosinophil-derived neurotoxin concentrations in nasal-lavage fluid after antigen challenge: effect of systemic corticosteroids and relationship to eosinophil influx. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:338-46.
16. Rasp G, Thomas PA, Bujia J. Eosinophil inflammation of the nasal mucosa in allergic and non-allergic rhinitis measured by eosinophil cationic protein levels in native nasal fluid and serum. *Clin Exp Allergy* 1994;24:1151-6.
17. Klimek L, Riechelmann H, Amedee R. Eosinophil cationic protein in nasal secretions and blood serum in

- grass-pollen allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 1996;10:319-23.
18. Walker SM, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Durham SR. Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study. *Allergy* 1995;50:405-13.
19. Pichler CE, Helbling A, Pichler WJ. Three years of specific immunotherapy with house-dust-mite extracts in patients with rhinitis and asthma: significant improvement of allergen-specific parameters and of nonspecific bronchial hyperreactivity. *Allergy* 2001;56:301-6.
20. Durham SR. New insights into the mechanisms of immunotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995;252 Suppl 1:S64-7.
21. Klimek L, Wolf H, Mewes T, Dormann D, Reske-Kunz A, Schnitker J, et al. The effect of short-term immunotherapy with molecular standardized grass and rye allergens on eosinophil cationic protein and tryptase in nasal secretions. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1 Pt 1):47-53.
22. Ohashi Y, Nakai Y, Kakinoki Y, Ohno Y, Sakamoto H, Kato A, et al. Effect of immunotherapy on serum levels of eosinophil cationic protein in perennial allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106(10 Pt 1):848-53.