

Aus der Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. h. c. T. Ruzicka

- I. Etablierung und Evaluation des IMDS-Modells zur prädiktiven Erfassung und Differenzierung photoreaktiver Substanzen
- II. Untersuchungen zur Charakterisierung der lokalen immunologischen Reaktionen während primärer photoallergischer und photoirritativer Reaktionen der Haut

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Andrea Blotz

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez. : Prof. Dr. med. D. Häussinger, Dekan

Referent : Prof. Dr. med. P. Lehmann

Korreferent : PD Dr. med. F.C. Schoebel

Meiner Familie

Vorwort

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Gudrun und Georg Blotz, die mir den Wunsch Medizin zu studieren erfüllt haben. Dieser Dank gilt ebenso meiner Schwester Iris Blotz, meiner Großmutter Lieselotte Dobirr und Herrn Claudius Schulz.

Herrn Prof. Dr. P. Lehmann möchte ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen auch über diese Arbeit hinaus danken.

Herrn Dr. Dr. Ahr danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in einer Kooperation zwischen der Forschungstoxikologie der Bayer AG, Wuppertal und der Dermatologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. H. W. Vohr für die intensive, freundliche und konstruktive Betreuung dieser Arbeit, für die wertvollen Diskussionen und Anregungen sowie für die vorbildliche und produktive Arbeitsatmosphäre in seinen Laboren.

Herrn B. Homey möchte ich für die Kontaktaufnahme, Koordination und sehr freundliche Einführung in das Labor der Bayer AG, Wuppertal danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau B. Hoffmann, Frau P. Leidenfrost, Frau S. Dörfling und Herrn H. Spiecker für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente.

Für die Förderung der vorliegenden Arbeit durch das BIOMED II Projekt der Europäischen Union möchte ich mich auf diesem Wege bedanken.

Tabellen Verzeichnis

Tab. 1: Einfluß der Applikation des Vehikels Aqua bidest und Bestrahlungseinheiten von 10 und 20 Joule/ cm ² auf die Ohrdicke, das Lymphknotengewicht und die Lymphknotenzellzahl	30
Tab. 2: Die Errechnung des IMDS-Quotienten am Beispiel von 8-Methoxypsoralen	32
Tab. 3: Dosis-Wirkungsbeziehung der Ohrdickenzunahme, der Lymphknotenzellproliferation und des IMDS-DI während der Induktionsphase photoallergischer Reaktionen	38
Tab. 4: Dosis-Wirkungsbeziehung photoirritativer Reaktionen am Beispiel von Sparfloxacin	40
Tab. 5: Dosis-Wirkungsbeziehung photoirritativer Reaktionen der Haut: BAY-Y-3118 und Lomefloxacin im IMDS-Modell	42
Tab. 6: Ciprofloxacin, Enoxacin, Norfloxacin und Ofloxacin im IMDS-Modell	43
Tab. 7: Enoxacin aus der Gruppe der Flour-Chinolone mit photoallergischem Potential	44
Tab. 8: Ofloxacin und Norfloxacin als schwache Photoirritantien mit einem photoallergischen Potential	45
Tab. 9: Der photoallergische Standard Olaquinox IMDS-Modell nach topischer Applikation	47
Tab. 10: Dosis-Wirkungsbeziehung des Neuroleptikums Chlorpromazin nach oraler Applikation	48
Tab. 11: Dosis-Wirkungsbeziehung des Neuroleptikums Chlorpromazin nach topischer Applikation	50
Tab. 12: Expression costimulatorischer Moleküle auf MHC Klasse II ⁺ epidermalen Zellen während der Induktionsphase photoallergischer und photoirritativer Reaktionen	53
Tab. 13: Aktivierung von Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen in der Epidermis während primärer photoallergischer und photoirritativer Reaktionen der Haut	56
Tab. 14: T-Zellrekrutierung und Einwanderung in die Epidermis und Expression des „Very Early Activation Antigen“ (CD69)	58
Tab. 15: Expression costimulatorischer Moleküle auf MHC Klasse II ⁺ Lymphknotenzellen während der Induktionsphase einer photoallergischen und photoirritativen Reaktion	60
Tab. 16: B-Zellaktivierung und die Expression des ‚Very Early Activation Antigen‘ (CD69) auf I-A [±] Zellen im lokal drainierenden Lymphknoten der Haut bei photoallergischen und photoirritativen Reaktionen der Haut	62
Tab. 17: Einwanderung CD11b ⁺ und CD11c ⁺ Zellen in den lokal drainierenden Lymphknoten der Haut während primärer photoallergischer und photoirritativer Reaktionen	64

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das TH1/TH2 Modell (Modifiziert nach Janeway Travers)	10
Abb. 2: Behandlungsschema des IMDS-Modells zur Induktion der Erstantwort bei epikutan und oral applizierten Substanzen	23
Abb. 3: Behandlungsschema zur Induktion der Erstantwort bei oral applizierten Substanzen	24
Abb. 4: Die Berechnung des IMDS-Differenzierungsquotienten	27
Abb. 5: Berechnung des IMDS-DI am Beispiel von 8-MOP	33
Abb. 6: Kinetischer Verlauf photoirritativer Reaktionen: Lokale Entzündungsreaktion der Haut	35
Abb. 7: Kinetischer Verlauf photoirritativer Reaktionen: Zellproliferation im lokal drainierenden Lymphknoten	36
Abb. 8: IMDS-Quotient auf der Basis der Kinetik von 8-MOP	37
Abb. 9: Darstellung des IMDS-DI am Beispiel von Sparfloxacin in Abhängigkeit von der Konzentration	41
Abb. 10 Dosis-Wirkungsbeziehung des Neuroleptikums Chlorpromazin nach oraler Applikation anhand des logarithmisch dargestellten IMDS-DI	49
Abb. 11: Expression costimulatorischer Moleküle auf MHC Klasse II ⁺ epidermalen Zellen während der Induktionsphase einer photoirritativen Reaktion in Abhängigkeit der lokalen Entzündungsreaktion, bzw. der applizierten Substanzmenge	54
Abb. 12: Assoziierte B-Zellaktivierung in lokal drainierenden Lymphknoten der Haut während primärer photoallergischer und photoirritativer Reaktionen	61

Abkürzungsverzeichnis

3T3 NRU PT	:	<u>N</u> eu <u>R</u> ed <u>U</u> ptake <u>P</u> hoto <u>T</u> oxicity
AG	:	<u>A</u> ntigen
AK	:	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
AP	:	<u>A</u> ntigen pr <u>ä</u> sentierende Zellen
BSA	:	<i>engl.</i> „ <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine“
CD	:	<i>engl.</i> „ <u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation“
CIPR	:	<u>C</u> ipro <u>f</u> loxacin
CTL	:	<u>C</u> ytotoxic <u>T</u> <u>L</u> ymphocyte
DMSO	:	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
DNA	:	<i>engl.</i> „ <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukle <u>i</u> n <u>a</u> cid“
DTH	:	<u>D</u> elayed <u>T</u> ype <u>H</u> ypersensitivity
DTIC	:	5-(3,3- <u>D</u> imethyl <u>t</u> riazeno)-4- <u>i</u> midazol <u>c</u> arboxamid
ECVAM	:	<u>E</u> uropean <u>C</u> entre for the <u>V</u> alidation of <u>A</u> lternative <u>M</u> ethods
ENOX	:	<u>E</u> noxacin
FACScan	:	<u>F</u> lourescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> canning
FCS	:	<i>engl.</i> „ <u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum“
FITC	:	<u>F</u> louresze <u>i</u> n- <u>I</u> sothiocyanat
I-A	:	<u>I</u> -region Associated <u>A</u> ntigen
ICAM	:	<i>engl.</i> „ <u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule“
IFN	:	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n
Ig	:	<u>I</u> mmunglobulin
IL	:	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
IL-2R	:	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin- <u>II</u> - <u>R</u> ezeptor
IMDS	:	<i>engl.</i> „ <u>I</u> ntegrated <u>M</u> odel for the <u>D</u> ifferentiation of chemical-induced allergic an irritant <u>S</u> kin Reactions“
KG	:	<u>K</u> örpergewicht
LFA	:	<i>engl.</i> „ <u>L</u> eucocyte <u>F</u> unctional <u>A</u> ntigen“
LLNA	:	<i>engl.</i> „ <u>L</u> ocal <u>L</u> ymph <u>N</u> ode <u>A</u> ssay“
LOME	:	<u>L</u> omefloxacin
MHC	:	<i>engl.</i> „ <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex“
MIP	:	<i>engl.</i> „ <u>M</u> acrophage <u>I</u> nfammatory <u>P</u> rotein“
MOP	:	<u>M</u> ethoxy <u>p</u> soralen

NORF	:	<u>N</u> orfloxacin
OECD	:	<u>O</u> rganisation for <u>E</u> conomic <u>C</u> ooperation and <u>D</u> evelopment
OFLO	:	<u>O</u> floxacin
OLAQ	:	<u>O</u> laquinox
PAD	:	<u>P</u> hoto <u>a</u> llergische <u>D</u> ermatitis
PBS	:	<i>engl.</i> „ <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline”
PE	:	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
PI	:	<u>P</u> hotoirritation
PTD	:	<u>p</u> hotoirritative <u>D</u> ermatitis
RNA	:	<i>engl.</i> „ <u>R</u> ibo <u>n</u> ukle <u>i</u> n <u>a</u> cid”
RT	:	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SPAR	:	<u>S</u> parfloxacin
TCSA	:	<u>T</u> etra <u>c</u> hlor <u>s</u> alicyl <u>a</u> nilid
T _H	:	<u>T</u> - <u>H</u> elfer
TNF	:	<u>T</u> umor <u>N</u> ekrose <u>F</u> aktor
UV	:	<u>U</u> ltraviolette Strahlung
UV-LLNA	:	<u>UV</u> -dependent <u>L</u> ocal <u>L</u> ymph <u>N</u> ode <u>A</u> ssay

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	2
1.1	Das Immunsystem der Haut.....	5
1.2	Photoreaktionen	6
1.2.1	Pathogenese photoirritativer Reaktionen.....	6
1.2.2	Pathogenese primärer photo-/kontaktallergischer Reaktionen der Haut.....	7
1.3	Anforderungen an prädiktive Testsysteme zur Erfassung photoreaktiver Substanzen... 11	
1.4	Das IMDS-Modell	14
1.5	Testsubstanzen	15
1.5.1	Referenzsubstanzen 8-MOP und Olaquinox	15
1.5.2	Der photoirritative Standard 8-Methoxypsoralen	15
1.5.3	Der photoallergische Standard Olaquinox	15
1.5.4	Flour-Chinolone.....	16
1.5.5	Chlorpromazin.....	17
1.6	Fragestellung und Ziele	18
2.	Material und Methoden	20
2.1	Versuchstiere	20
2.2	Applikationssubstanzen	20
2.3	Verbrauchschemikalien	21
2.4	Antikörper	21
2.5	Geräte.....	22
2.6	Applikationsansätze	22
2.7	Behandlungsprotokoll zur Induktion der Primärantwort bei lokal applizierten Substanzen	23
2.8	Behandlungsprotokoll zur Induktion der Primärantwort bei oral applizierten Substanzen	24
2.9	Berechnung der Zunahme der Ohrdicke.....	25
2.10	Wägung der Lymphknoten und Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.11	Berechnung des Lymphknoten-Stimulationsindex	26
2.12	Berechnung des IMDS-Differenzierungsindex	26
2.13	Herstellung einer Epidermis-Zellsuspension	27
2.14	Durchflußzytometrische Analysen	28
2.15	Statistik	28

3.	Ergebnisse	29
3.1	Etablierung des IMDS-Modells zur prädiktiven Erfassung photoallergischer und photoirritativer Substanzen	29
3.1.1	Der photoirritative Standard 8-Methoxypsoralen im IMDS-Modell	31
3.1.2	Etablierung des IMDS-Modells für photoirritative Substanzen anhand der Kinetik von 8-MOP	34
3.1.3	Der photoallergische Standard Olaquinox im IMDS-Modell	37
3.2	Flour-Chinolone im IMDS-Modell.....	39
3.2.1	Die photoirritative Substanz Sparfloxacin im IMDS-Modell	39
3.2.2	Schwache Photoirritantien aus der Gruppe der Flour-Chinolone	42
3.2.3	Flour-Chinolone mit photoallergischem Potential	44
3.3	Das IMDS-Modell zur Prüfung topisch applizierter photoreaktiver Substanzen	46
3.3.1	Der photoirritative Standard 8-MOP nach topischer Applikation im IMDS-Modell	46
3.3.2	Der photoallergische Standard Olaquinox nach topischer Applikation im IMDS-Modell.....	46
3.4	Validierung des IMDS-Modells anhand von Chlorpromazin.....	47
3.5	Zelluläre Ereignisse in der Epidermis während photoallergischer und photoirritativer Reaktionen der Haut	51
3.5.1	Expression costimulierender Moleküle auf I-A ⁺ Epidermiszellen.....	51
3.5.2	Einwanderung von CD11b ⁺ und CD11c ⁺ Zellen in die Haut im Rahmen photoallergischer und photoirritativer Reaktionen der Haut	54
3.5.3	Epidermale T-Zell-Rekrutierung und die Expression des „Very Early Activation Antigen“ (CD69) auf I-A ⁺ Zellen der Epidermis	57
3.6	Zelluläre Ereignisse in lokal drainierenden Lymphknoten der Haut.....	59
3.6.1	Expression costimulierender Moleküle auf I-A ⁺ Zellen in lokal drainierenden Lymphknoten der Haut	59
3.6.2	B-Zellaktivierung und Expression des „Very Early Activation Antigen“ (CD69) auf I-A ⁺ Lymphknotenzellen	60
3.6.3	Einwanderung CD11b ⁺ und CD11c ⁺ Zellen in den lokal drainierenden Lymphknoten.....	63
3.6.4	T-Zellaktivierung im lokal drainierenden Lymphknoten	65
4.	Diskussion.....	66
4.1	Das IMDS-Modell zur Untersuchung photoreaktiver Substanzen	67
4.1.1	Flour-Chinolone im IMDS-Modell.....	74
4.1.2	Flour-Chinolone mit photoallergischem Potential	75
4.2	Das IMDS-Modell zur Untersuchung photoreaktiver Problemsubstanzen	77
4.3	Lokale immunologische Reaktionen	78
5.	Ausblick.....	85
6.	Zusammenfassung.....	87
7.	Literaturverzeichnis	89

1. Einleitung

Photoreaktionen der Haut stellen ein wachsendes Problem der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie, der Immunologie sowie der Dermatologie in Forschung und Praxis dar (*Haen et al., 1988*). Sie entstehen nach systemischer oder lokaler Applikation photoreaktiver Substanzen und anschließender UV-Exposition.

Unter dem Begriff der Photoreaktion werden photoallergische und photoirritative Reaktionen zusammengefaßt (*Ippen, 1993*).

Photoallergische und photoirritative Reaktionen äußern sich klinisch als akute oder chronische Dermatitis und treten mehrere Stunden bis wenige Tage nach Lichtexposition auf. Hauptsächlich sind lichtexponierte Areale (Gesicht, Hals, Hände und Dekolleté) betroffen (*Neumann et Lehmann, 2000, Pigatto et al., 1996*).

Sie stellen Sonderformen einer Kontaktallergie und einer Irritation dar und sind durch Ödembildung, Erythem, Schuppung und Juckreiz der Haut charakterisiert.

Als exogen zugeführter Auslöser dieser Hautreaktionen sind Medikamente wie Antibiotika, insbesondere Fluorchinolone, Antiepileptika, Farbstoffe, Teerderivate, pflanzliche Stoffe (Furocoumarine), etc. bekannt (*Schauder, 1990*). Photoreaktive Stoffe sind damit in der gesamten Welt allgegenwärtig. Das „Comitee Internationale d'Eclairage“ hat 1993 insgesamt 15.000 Chemikalien als photosensibilisierend deklariert.

Photoallergische und photoirritative Kontaktekzeme können durch eine Vielzahl sogenannter sekundärer Pflanzenstoffe (z.B. Urushiol aus dem amerikanischen Efeu) hervorgerufen werden. Schon im Jahre 1500 vor Christi Geburt rieben ägyptische Ärzte zerkleinerten Samen der Pflanze *Ammi majus* (Knorpelmöhre) auf erkrankte Stellen der Haut und konnten exacerbierte Verbrennungen nach Sonnenlichtexposition beobachten.

Nach heutigem Wissen stammen die meisten Photosensibilatoren in der floralen Umgebung des Menschen aus der Stoffgruppe der Psoralene (Furocoumarine), die beispielsweise in der Herkulesstaude (*Heracleum spec.*), dem Feigenbaum (*Ficus carica*) oder der Selleriestauden (*Apium graveolens*) anzutreffen sind. Sie rufen eine

sogenannte Phytophotodermatitis hervor (*Lagey et al, 1995*). Dies ist eine, gegenüber dem Sonnenbrand protrahiert verlaufende Entzündung der Haut mit starker post eruptiver Pigmentierung (*Jung, 1995*).

Die Wellenlängen, welche mit der lichtabsorbierenden Substanz in Reaktion treten, und zu den oben beschriebenen Hauterscheinungen führen, liegen vorwiegend im UV-A-Bereich (320- 400nm) und zum Teil im Bereich des sichtbaren Lichts.

Sprachlich gesehen, bietet das Feld der Photoreaktionen bis heute große Verwirrungen. Häufig werden die Begriffe Photosensibilisierung, Phototoxizität, Photoirritation und Photoallergie synonym benutzt.

Nach der Nomenklatur von Ippen werden photoallergische und photoirritative Reaktionen als zwei Arten der Photosensibilisierung, unter der man ursprünglich die fotografische Zersetzung von Silbersalzen verstand, klar differenziert (*Ippen, 1993*). Photosensibilisierung sollte heute nur noch im Sinne der chemischen Aktivierung benutzt werden und Phototoxizität als Oberbegriff für medizinische und biologische Reaktionen.

Eine sehr ernstzunehmende Gruppe der photoreaktiven Substanzen stellen topische und systemisch applizierte Medikamente, wie Antibiotika, Antiphlogistika, antiinflammatorische Substanzen, Antihypertensiva, Antimykotika, Antirheumatika, Psoralene, Psychopharmaka, Neuroleptika, etc. dar (*Allen, 1993 und Gould et al., 1995*).

Daß oral verabreichte Medikamente Photodermatosen hervorrufen können, zeigte sich 1945 in Nordafrika und Italien. Nach der Einnahme von Sulfonamiden entwickelten 361 von 500 Patienten schwere Sonnenbrände mit Blasenbildung und Beeinträchtigung des Herz-Kreislaufsystems (*Peterkin, 1945*).

Zwar zwingt eine photoallergische oder photoirritative Reaktion der Haut nach Medikamentengabe nicht immer zwangsläufig zum sofortigen Therapieabbruch, sondern kann durch Verhaltensmaßnahmen, wie Vermeidung von Sonnenexposition, angemessener Kleidung oder Reduktion der Medikamentendosis vorerst unter Kontrolle gehalten werden, jedoch kann es auch akut zu schweren

Verbrennungserscheinungen mit Fieber und Kreislaufschock kommen (*Johnson et Ferguson, 1990*).

In den letzten Jahren wurden in Phase III und IV Studien einiger Propionsäure-Derivate und Flour-Chinolone schwere photoirritative Reaktionen bei Patienten ausgelöst. Ein zuverlässiges Screening-Modell könnte das photoreaktive Potential bereits in Phase II Studien erkennen und eine gezielte Weiterentwicklung ermöglichen sowie Kosten einsparen. Mit dem Wissen um die Photoreaktivität könnten rechtzeitig entsprechende Maßnahmen zur Lichtprotektion eingeleitet werden und das Medikament mit Einschränkungen, beispielsweise für Intensivstationen zugelassen werden. Einige neu entwickelte Flour-Chinolone wie BAY-Y-3118 wären heute eine Bereicherung im klinischen Alltag beim Einsatz gegen multiresistente Keime.

Die hier aufgezeigte klinische Relevanz zeigt die Notwendigkeit eines labortechnisch einfachen Screening- und Differenzierungstestes auf.

Der pharmazeutischen Industrie könnten bei der Arzneimittelentwicklung mittels eines zuverlässigen Testverfahrens Zeit und Kosten erspart bleiben, dem Endverbraucher, also dem Patienten, unnötige Nebenwirkungen. Momentan hat die European Medicines Evaluation Agency (EMA) noch keine legislative Grundlage geschaffen, die der pharmazeutischen Industrie vorschreibt, ihre neu entwickelten Substanzen zu testen.

Die EU ist sich jedoch des Problems bewußt und versucht mit der COLIPA (Cosmetic Manufacturers Association), neue *in vitro* Modelle zu entwickeln (*Liebsch, 1997*). Durch den zunehmenden Bedarf und der rapiden Entwicklung neuer Substanzen und Arzneistoffe werden einem Testmodell nicht nur Schnelligkeit und vertretbare Kosten, sondern auch Transparenz und Zuverlässigkeit abverlangt.

Ein solches Testverfahren ist nur auf der Grundlage des Verständnisses der pathophysiologischen Mechanismen möglich, die zu photoallergischen oder photoirritativen Hauterscheinungen führen.

1.1 Das Immunsystem der Haut

Aufgabe der Haut ist es, die Integrität des Organismus durch ein komplexes Überwachungs- und Eliminierungssystem sicherzustellen. Als größtes Organ des menschlichen Körpers bietet sie ein faszinierendes Netzwerk verschiedenster lebenswichtiger Funktionen. In ihrer Rolle als erste Abwehrlinie für sämtliche äußere Noxen ist sie ein immunologisch privilegiertes Organ.

Physikalisch dient sie als Barriere gegen die eventuell schädigende Außenwelt. Die relative Impermeabilität für Wasser und wasserlösliche Stoffe, die strukturelle Integrität bei mechanischer Belastung und Traumata, die pH-Barriere gegen Mikroorganismen, sowie die optischen Eigenschaften zum Schutz vor den potentiell negativen Auswirkungen des UV-Lichtes sind ihre herausragenden Leistungen.

Der Schutz vor exogenen schädlichen Einflüssen wird hauptsächlich von der Epidermis geleistet. Keratinozyten, die Zellen der Epidermis, produzieren nicht nur Keratin und bilden nach ihrem programmierten Zelltod die sogenannte Hornhaut, sie sezernieren auch eine Vielzahl von Zytokinen und inflammatorischen Proteinen, wie IL-1alpha, IL-8 (entspricht MIP-2 der Maus [Macrophage Inflammatory Protein-2]), IL-10 und den Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-alpha). Sie können außerdem zur Expression von MHC Klasse II Moleküle angeregt werden.

Langerhanszellen repräsentieren die potentesten antigenpräsentierenden Zellen der Haut. Sie sind in der Lage, im Rahmen einer antigeninduzierten Immunantwort Antigene zu phagozytieren, zu prozessieren und relevante antigene Determinanten nach der Migration von der Haut über afferenten Lymphbahnen in den lokal drainierenden Lymphknoten T-Zellen zu präsentieren. Langerhanszellen können ferner Zytokine wie IL-1 beta sezernieren und auf ihrer Oberfläche die costimulierenden Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) exprimieren (*Kampgen et al.*, 1991). Im lokal drainierenden Lymphknoten aktivieren sie als reife, immunologisch hochaktive Zellen T-Helfer-Zellen. Ferner werden im Rahmen inflammatorischer Reaktionen insbesondere aktivierte T-Zellen in der Dermis und Epidermis gefunden (T-Zell-Recruitment) (*Enk et Katz*, 7/1995).

Immunologisch kompetente Zellen der Dermis und Epidermis bilden mit den jeweiligen regionalen Lymphknoten eine Funktionseinheit, die als „SALT“

(Skin Associated Lymphatic Tissue) bezeichnet wird und das „lokale Immunsystem der Haut“ nach *Bos und Kapsenberg (1993)* repräsentieren.

1.2 Photoreaktionen

Unter dem Oberbegriff Photoreaktionen werden photoallergische und photoirritative Reaktionen zusammengefaßt.

1.2.1 Pathogenese photoirritativer Reaktionen

Das klassische Beispiel einer photoirritativen Erscheinung ist der „Sonnenbrand“, ein Strahlenerythem, das bis hin zu Ödem- und Blasenbildungen neigt. Es entwickelt sich in Abhängigkeit von Bestrahlungsdauer, -dosis und Adaptationsfähigkeit der Haut (Lichtschwiele, Melaninpigmentierung).

Photoirritative Substanzen können die Reaktionsschwelle zur Ausbildung einer irritativen Hautreaktion stark herabsetzen. Die Substanz oder ein Metabolit derselben lagert sich in der Haut ab, kann dort in Wechselwirkung mit dem UV-Licht treten und eine photoirritative Hautreaktion provozieren. Im Gegensatz zu den allergischen Reaktionen kann eine solche Hautirritation schon bei Erstkontakt auftreten und eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigen.

Photoirritativen Reaktionen liegen keine immunogenen Hapten-Protein-Komplexe zugrunde. Mechanistisch handelt es sich um eine direkte irritative Wechselwirkung einer durch UV-Bestrahlung veränderten Substanz mit einer Zelle oder einem Zellbestandteil. Durch UV-Einwirkung auf die betreffende Substanz kommt es zur Bildung toxischer Sauerstoffderivate: Sauerstoff-Radikale, Superoxid-Anionen oder Hydroxyl-Radikale (*Jensen, et al., 1987*). Durch Interaktion dieser Sauerstoffderivate mit Zellbestandteilen werden z.B. Aminosäuren oder ungesättigte Membranlipide oxidiert. Die daraus resultierenden DNS- und Zellmembranschäden induzierten dann die photoirritative Reaktion (*Harber et al., 1989, Wagai et al., 1991, Spielmann et al., 1997*).

Um die photosensibilisierenden Substanzen und die Mechanismen ihrer Entstehung zu strukturieren, unterteilt man sie in sogenannte primäre und sekundäre

Photosensibilatoren. Primäre Photosensibilisatoren wirken als unveränderte Ausgangssubstanz. Sekundäre Photosensibilisatoren werden durch verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise durch Metabolisierung, durch spezifische Bindung oder durch Zersetzung, Oxidation und Wärme erzeugt.

1.2.2 Pathogenese primärer photo-/kontaktallergischer Reaktionen der Haut

Photoallergien können im Gegensatz zu Photoirritationen über das lichtexponierte Hautareal hinaus generalisieren oder eine sogenannte „persistierende Lichtreaktion“ auslösen, die eine über die Expositionszeit hinaus substanzunabhängige Lichtsensibilität darstellt. *Hawk und Magnus (1979)* beschrieben Fälle, bei denen sich aus einer persistierenden Lichtreaktion ein aktinisches Retikulum ausbildete, welches die Grundlage für ein Lymphom der Haut bilden kann.

Ippen unterscheidet innerlich ausgelöste photoallergische Ekzeme, z.B. durch oral oder *intra venös* applizierte Medikamente und photoallergische Kontaktekzeme, die durch äußerliche Anwendung von Salben oder Tinkturen entstehen können (*Ippen et al., 1993*).

Bei beiden Arten der Photoallergie wird die betreffende Substanz oder einer ihrer Stoffwechselmetaboliten in der Haut angereichert und tritt dort in Wechselwirkung mit dem UV-Licht. In jüngerer Zeit konnten *Pendington et al. (1990)* zeigen, daß UV-Bestrahlung die Bildung freier Radikale oder aktiver Zwischenprodukte in der Haut induziert. Die Substanz wird so in eine reaktionsfähige Verbindung (Prohaptent) überführt. Diese reaktiven, meist kurzlebigen Zwischenstufen können mit körpereigenen Molekülen (Protein) eine kovalente Verbindung (Haptent-Protein-Komplex) eingehen. Haptent-Protein-Komplexe sind dann in der Lage, eine allergische Reaktion zu verursachen. Photoirritative Substanzen hingegen bilden keinen immunogenen Haptent-Protein-Komplex aus (*Spielmann et Liebsch, 1995*).

Der Hauptunterschied zwischen kontaktallergischen und photoallergischen Reaktionen ist also, daß im Rahmen der Photokontaktallergie das Haptent oder Hautkomponenten zuerst mit relevanten Dosen und Wellenlängen von UV-Strahlung interagieren müssen, um eine Bindung der Substanz an Selbst-Protein zu ermöglichen, um so zum Photoallergen zu werden. Die folgenden Hautkomponenten können durch Photoenergie aktiviert werden: Aminosäuren und Proteine,

Blutkomponenten, Lipoproteine, DNA und RNA. Es wurden sechs mögliche Reaktionsformen zwischen Hapten, UV-Strahlung und Hautkomponenten von *Stork* beschrieben:

1. Das Prohapten wird durch absorbierte Lichtquanten zum Hapten transformiert.
2. Durch die absorbierten Lichtquanten wird der aktive Protein-Carrier für das Hapten aus Hautproteinen gebildet.
3. Die UV-Strahlung führt zur Bildung eines Haptens, daß an Hautproteine bindet und zum Antigen wird.
4. Das Hapten bindet an Protein, welches durch UV-Strahlung verändert wurde.
5. Hapten und Protein werden durch UV-Strahlung verändert und bilden gemeinsam das Antigen.
6. Das Hapten und die UV-Strahlung katalysieren eine chemische Reaktion im Protein, die zur Antigenbildung führt.

Nach Antigenbildung und Phagozytose durch antigenpräsentierende Zellen verlaufen die folgenden immunologischen Prozesse bei der Photoallergie analog zu denen der Kontaktallergie.

Beide Reaktionsformen repräsentieren eine Typ IV Reaktion nach *Coombs und Gell (1963)* und zeigen einen crescendoartigen Verlauf. Bei dieser zellvermittelten Immunreaktion wird die Erkrankung nicht durch Antikörper, sondern unmittelbar durch spezifische T-Lymphozyten ausgelöst und ist damit nicht durch Serum übertragbar. Inzwischen hat es sich als zweckmäßig erwiesen, den zellulären Reaktionstyp IV in a und b zu untergliedern.

Typ IV a stellt eine cytotoxische, allergische Reaktion dar, bei der CD8⁺ T-Lymphozyten antigentragende Zellen direkt zerstören. Bei der zellvermittelten Reaktion vom verzögerten Typ IV b spielen sensibilisierte CD4⁺ T-Zellen die herausragende Rolle.

Während der Ausprägung primärer kontaktallergischer Reaktionen nehmen CD4⁺ T-Zellen eine Schlüsselposition ein. Sie werden während der Präsentation von Antigenen durch spezialisierte Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen)

stimuliert und nehmen durch die Sekretion von Zytokinen einen selektiven Einfluß auf den weiteren Verlauf der Immunantwort.

In den letzten Jahren wurde erkannt, daß von T_H -Lymphozyten zwei Subpopulationen existieren, die sich vor allem durch ihr Zytokinmuster unterscheiden, durch das sie sich als T_H1 - und T_H2 -Zellen definieren. Ausgehend von der undifferenzierten T_H0 -Zelle, die IL-2, -4 und IFN-gamma produzieren kann, spezialisieren sich die T_H -Zellen durch einen Maturationsprozeß.

T_H1 -Zellen sezernieren Interleukin-2, den Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten sowie IFN-gamma. IFN-gamma aktiviert antigenpräsentierende Zellen und fördert die zellulär vermittelte Immunität. T_H2 -Lymphozyten regulieren durch die Sekretion von IL-4, -5, -6, -10 und -13 die Antikörpersynthese von B-Zellen und nehmen Einfluß auf die Immunglobulin-Isotypen. B-Lymphozyten können beispielsweise ohne IL-4 kein IgE synthetisieren. IL-4, wie auch IL-10 und IL-13 lenken die Differenzierung in Richtung T_H2 -Zellen, während IFN-gamma die Differenzierung zu T_H1 lenkt.

Damit fördern die T_H Subpopulationen ihre eigene Entwicklung zum Teil über andere Zellen, wie den natürlichen Killerzellen und hemmen gleichzeitig die Reifung anderer Subpopulationen (Abb. 1).

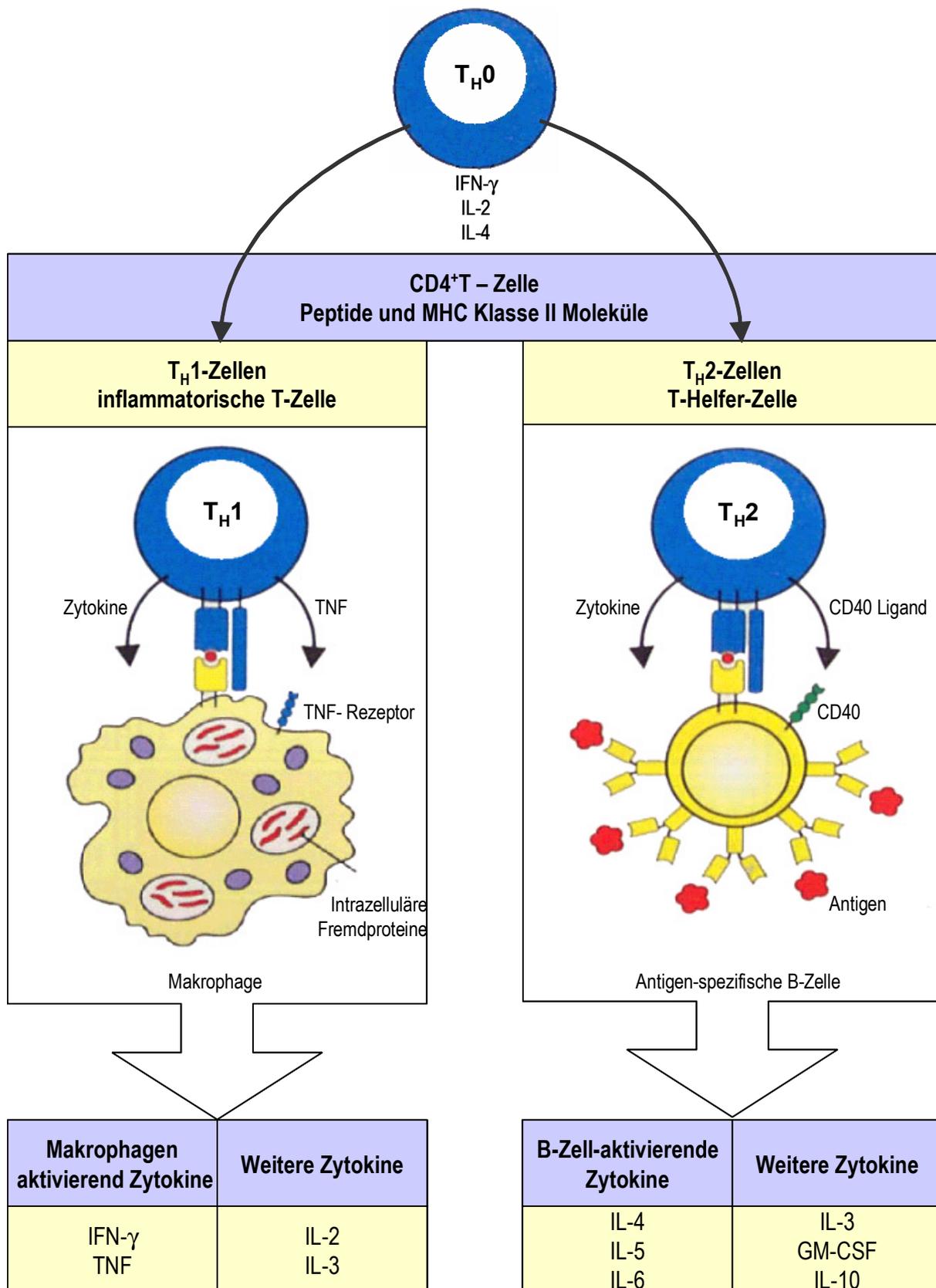


Abb. 1: Das TH1/TH2 Modell (modifiziert nach Janeway Travers)

T-Lymphozyten können Antigene nur dann erkennen, wenn sie von antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen) an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) gebunden präsentiert werden. Die Struktur der MHC Moleküle erlaubt nur die Präsentation von Peptiden, die aus 8-25 Aminosäuren bestehen. Proteine müssen also zuvor von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und zu kleinen Peptiden zerlegt werden. Kleinere molekulare Stoffe, wie die meisten Arzneimittel werden nur dann an ein kleines Peptid gebunden bleiben, wenn die Bindung fest, in der Regel kovalent, ist. Das relevante Antigen entsteht aus der kovalenten Bindung des Haptens mit dem Selbst-Protein, z.B. der Haut.

Einige chemische Substanzen durchlaufen erst metabolische Prozesse, in deren Folge ihre Metaboliten durch kovalente Bindung oder durch Komplexbildung mit dem Selbstproteinen zu einem „altered self“ und somit zur Antigenbildung führen. Liegt eine Sensibilisierung vor, wird bei erneutem Kontakt mit dem Arzneimittel eine allergische Reaktion ausgelöst, die klinisch zum Bild der Photo-/Kontaktallergie führt.

1.3 Anforderungen an prädiktive Testsysteme zur Erfassung photoreaktiver Substanzen

Aus den grundlegenden Entstehungsmechanismen photoallergischer und photoirritativer Reaktionsmuster ergeben sich die komplexen Anforderungen und Entwicklungsmöglichkeiten eines Screeningtestes.

Aktuell gibt es weder ein Testsystem welches oral applizierte Substanzen hinsichtlich ihres photoirritativen Charakters, noch ihres photoallergischen Charakters prüfen kann.

Aktuelle Testsysteme konzentrieren sich entweder ausschließlich auf die Untersuchung epikutan applizierter Arzneimittel oder untersuchen die direkte Wirkung der Substanz auf bestimmte Zellsuspensionen.

Vorab ist festzustellen, daß bei Testmodellen die Gefahr falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse um so größer wird, je mehr sich das betreffende Modell (Prokaryonten, Eukaryonten, Erythrozyten oder Nacktmäuse) biochemisch und

strukturell von der menschlichen Haut und damit dem Erfolgsorgan der Photosensibilisierung unterscheidet.

Bei sekundären Photosensibilisatoren nehmen die Anforderungen an den Testansatz weiter zu, wie das folgende Beispiel zeigt. *Dacarbazin* (DTIC) ist ein Zytostatikum, dessen photoirritative Potenz nach intravenöser Gabe klinisch beobachtet werden konnte (*H. Ippen, 1993*). Es wird in der zytostatischen Nachbehandlung des Malignen Melanoms eingesetzt. Seine Lichtinstabilität ist bekannt, und Patienten wird angeraten, nach jeder Behandlung ein Sonnenschutzmittel zu benutzen. *Kunze et al.* beobachteten die Abnahme der zum Erythem notwendigen Bestrahlungszeit nach DTIC-Applikation an einer Patientengruppe (*Kunze, 1980*).

Bolling et al. versuchten, diese Wirkung nach dermalen Applikation und sofortiger Belichtung zu reproduzieren, was allerdings nicht gelang. (*Bolling et al., 1981*). Belichtungstests in verschiedenen Zeitintervallen nach Infusion der Substanz zeigten erst etwa nach vier Stunden eine vorübergehend stark erhöhte UV-A Empfindlichkeit der Haut. Hieraus kann gefolgert werden, daß erst ein später in der Haut erscheinender Metabolit die Lichtsensitivität hervorrufen kann und ein sogenannter sekundärer Photosensibilisator vorliegt. Substanzen, wie die Furocoumarine beispielsweise, müssen erst lichtunabhängig mit der DNA interkalieren und so einen über Nebervalenzen fixierten Komplex bilden, um ihre photoirritative Potenz entwickeln zu können.

In den letzten Jahren versuchte man Photoreaktionen nach epikutaner Applikation durch Modifikation der biphasischen Testsysteme: Bühler Occluded Patch Test (*Bühler, 1965*) und Guinea Pig Maximization Test (GMPT) zu untersuchen (*Magnusson et Klingman, 1969*). Der sogenannte Bühler-Test benötigt 10-20 Meerschweinchen pro Gruppe, bei einem Versuchszeitraum von 40 Tagen.

Der GMPT ist in 30 Tagen durchführbar, benötigt 25 Meerschweinchen pro Gruppe und erfordert aufwendige Applikationsmodalitäten, wie z.B. eine genaue, nicht irritativ wirkende Schwellendosis der zu untersuchenden Substanz.

Um die Sensitivität des Testes zu erhöhen, wird das Testareal mit 10% Natriumeaurylsulfat vorbehandelt, welches den Reaktionsablauf, insbesondere bei photoreaktiven Stoffen beeinflussen kann.

Ein weiteres Problem stellt die Durchführung der streng intradermalen Injektion dar. Diese Versuchsmodalitäten verlangen einen hohen personellen, zeitlichen und finanziellen Aufwand, um eine Aussage über die photo-/irritative, bzw. photo-/allergische Potenz treffen zu können.

Der GMPT und der Bühler-Test unterliegen beide einer rein subjektiven Erythem-Einschätzung des Versuchsdurchführers und der damit verbundenen Varianz.

Farbige Testsubstanzen oder solche, die als Photokontaktallergene selbst ein hohes intrinsisch irritatives oder photoirritatives Potential aufweisen, können ihrerseits zu zweifelhaften Ergebnissen führen (*Hoelzle et al., 1991*).

Mit der Einführung des Local Lymph Node Assay (LLNA) durch Kimber und Weisenberger im Jahre 1989 wurde ein *in vivo* Modell mit einem klar definierten und objektivem Endpunkt, dem Proliferationsindex der Lymphknotenzellzahl etabliert (*Kimber et al., 1989*).

Der LLNA wurde 1992 in die Richtlinien der OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) für die immuntoxikologische Risikoanalyse neuer Substanzen aufgenommen. Testchemikalien, die eine positive Reaktion im Lymphknoten zeigen, werden als Allergene identifiziert. Bei einem negativen Testergebnis werden allerdings auch weiterhin Guinea Pig-Maximisation Tests (GMPT) gefordert, um das negativ- Ergebnis zu bestätigen (*Kimber et Weisenberger, 1989 und Basketter et Gerberick, 1996*). Validierungen in verschiedenen voneinander unabhängigen Laboratorien zeigen den hohen prädiktiven Wert des LLN-Proliferations-Index (*Chamberlain et Basketter, 1996 und Chamberlain et Hilton, 1991*).

Scholes versuchte 1992 erstmalig Photokontaktallergene mit dem LLNA zu testen (*Scholes et Basketter, 1992*). Dieser UV-LLNA kann photoreaktive Substanzen nur nach topischer, nicht jedoch nach oraler Applikation testen. Er ist ebenso wie die oben genannten Testsysteme nicht in der Lage, zwischen photoirritativen und photoallergischen Substanzen zu differenzieren. Allerdings besitzt der LLNA als monophasisches und objektives Testsystem wesentliche Vorteile gegenüber den o. g. biphasischen Systemen.

Um der Problemlösung der Differenzierbarkeit zwischen Photo-/Kontaktallergie und Photo-/Irritation näher zu kommen, wurde das (UV-) LLNA-Modell weiter modifiziert, und man konzentrierte sich auf immunologisch relevante Zellpopulationen im lokal drainierenden Lymphknoten: CD4⁺ T-Zellen und AP-Zellen (Vohr, 1994). Ulrich et Vohr konnten zeigen, daß das modifizierte LLNA-Modell auch auf photoreaktive Substanzen anwendbar ist (Ulrich et Vohr, 1996).

Um dieses Testmodell zu vereinfachen konzentrierte man sich auf immunologische Endpunkte kontaktallergischer und irritativer Reaktionen der Haut.

1.4 Das IMDS-Modell

Das IMDS-Modell (Integrated Model for the Differentiation of chemical-induced allergic and irritant Skin reactions) erfährt seine Diskriminierungsfähigkeit durch Messung einfacher, immunologisch relevanter Endpunkte der Haut und der lokal drainierenden Lymphknoten. Diese Endpunkte wurden aufgrund jahrelanger Beobachtungen und immunologischer Forschungsergebnisse ausgewählt.

Das Verhalten der Ohrdicke dient als Meßgrundlage für das Ausmaß der Inflammation der Haut als charakteristischstes Merkmal photo-/irritativer Reaktionen. Die Proliferation der lokal drainierenden Lymphknoten fällt selbst bei starker Hautinflammation in den ersten vier Tagen einer photo- /irritativen Reaktion vergleichsweise gering aus (Schilling, Diplomarbeit, 2000).

Photo-/allergische Reaktionen zeigen eine massive Lymphknotenproliferation bei geringer bis fehlender Entzündungsreaktion der bestrahlten Hautareale. Als Maß der Lymphknoten-Aktivierung wird ein Index aus der Lymphknotenzellzahl der Testgruppe und der Vehikel-Gruppe gebildet. Das IMDS-Modell ist ein monophasisches Modell, welches die photoreaktiven Eigenschaften einer Substanz innerhalb von vier Versuchstagen testen kann und die Substanzen in photoirritativ und photoallergisch differenziert.

Neben den photodermatologischen Aspekten spielt die Abschätzung des immuntoxischen Risikos eine maßgebliche Rolle. Dieses Risiko beeinflusst nicht nur

den Rahmen, in dem das Medikament eingesetzt werden kann, sondern auch dessen Zulassung als Arzneimittel.

Das IMDS-Modell ist in der Lage, photo-/allergische und photo-/irritative Substanzen bereits in der Induktionsphase als solche zu erkennen. Weiter ist es das erste Testsystem, welches anhand eines Differenzierungsindex eine klare Differenzierung zwischen photo-/allergischen und photo-/irritativen Substanzen nach oraler Applikation ermöglicht. Dies ist nicht nur für die chemische und pharmazeutische Industrie von herausragender Bedeutung, sondern vor allem für Patienten.

1.5 Testsubstanzen

1.5.1 Referenzsubstanzen 8-MOP und Olaquinox

Basierend auf den Empfehlungen der COLIPA bezüglich photoirritativer und photoallergischer Standardtestsubstanzen wurden in der vorliegenden Arbeit 8-MOP als photoirritative und Olaquinox als photoallergische Referenzsubstanz benutzt.

1.5.2 Der photoirritative Standard 8-Methoxypsoralen

8-MOP wird als Photochemotherapeutikum im Rahmen der PUVA-Therapie eingesetzt, um vor allem bei schweren Formen der Psoriasis, Psoriasis en Plaque, Mycosis fungoides, der Vitiligo und anderen Dermatosen die photoirritative Wirkung dieses Psoralens therapeutisch auszunutzen (*Oakley et al., 1996; Pier et al., 1993; Mobacken et al., 1983 und Wiessmann et al., 1978*).

8-MOP wird klinisch sowohl topisch als auch systemisch angewendet, was die Etablierung des IMDS-Modells für beide Applikationswege möglich macht (*Bech-Thomson, 1994*).

1.5.3 Der photoallergische Standard Olaquinox

Olaquinox wurde in der vorliegenden Arbeit als Referenzsubstanz photoallergischer Reaktionen genutzt, da in klinischen Untersuchungen kein photoirritatives Begleitpotential beschrieben wird. Auch in dem sensiblen Photo Hen's Egg Test wurde kein photoirritatives Potential von Olaquinox beobachtet (*persönliche Mitteilung Dr. N. Neumann vom 20.5.2001*).

Olaquinox wurde aus der Vorläufersubstanz Quinoxin entwickelt, um als Wachstumspromoter Gastroenteritiden in der Schweinezucht vorzubeugen. Das photoallergische Potential beider Substanzen machte sich vor allem bei Landwirten bemerkbar, die bei der Tierfütterung mit Olaquinox in Kontakt kamen und bei der Feldarbeit der Sonne exponiert waren. Bei den Mischvorgängen des Tierfutters gelangt Olaquinox in die Luft und kann so aerogen oder oral aufgenommen werden. Die geringe auslösende Konzentration beschreibt einmal mehr das photoallergische Potential dieser Substanz und die Wichtigkeit seiner Erkennung, da sie über die Tierfütterung in die menschliche Nahrungskette gelangt.

1.5.4 Flour-Chinolone

Nalidixinsäure stellt mit ihrer Einführung im Jahre 1962 die Ausgangssubstanz chemisch-synthetisch hergestellter Flour-Chinolone dar (*Wolfson et al., 1990*). Es hat sich vor allem als Chemotherapeutikum gegen Infektionen der ableitenden Harnwege bewährt. Die in den darauf folgenden 20 Jahren abgewandelten Derivate erlangten nur wenig oder, wie die Pipemidsäure, eine in etwa gleichwertige klinische Bedeutung.

Wegen ihres Hemmeffekts auf die bakterielle DNA-Gyrase werden sie auch „Gyrase-Hemmer“ genannt. Sie blockieren die Topoisomerase II und damit die Faltung der DNA-Helix zu Schleifen-Domänen (*Burry et al., 1966*).

Norfloxacin leitete 1982 die aktuell anhaltende erfolgreiche Entwicklung der Flour-Chinolone ein. Bereits kurze Zeit nach der Einführung der Nalidixinsäure wurde ihre photoirritative Potenz registriert.

1993 hat die „Food and Drug Administration“ der USA die Anzahl der an Patienten ausgegebenen Rezepte für vier verschiedene Chinolone mit der Anzahl der auf diese zurückzuführenden Photoreaktionen der Haut verglichen. Auf eine Millionen Verschreibungen für Ciprofloxacin kam ein registrierter Fall, für Norfloxacin zwei Fälle, 20 Fälle für Ofloxacin und 70 Fälle für Lomefloxacin (*Food, 1993*). Zu berücksichtigen bleibt die wahrscheinlich sehr hohe Dunkelziffer der Erkrankungsfälle, v.a. in den USA.

Den momentan bei uns zugelassenen Präparaten (Norfloxacin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Enoxacin, Cinoxacin, Pefloxacin, Flerofloxacin) werden bald andere wie Moxifloxacin folgen.

1.5.5 Chlorpromazin

In der Literatur werden zwei zuerst völlig konträr erscheinende Phänomene lichtabhängiger Reaktionen auf Chlorpromazin beschrieben. Nach oraler Applikation kann es zu photoirritativen und nach topischer Applikation zu photoallergischen Reaktionen kommen.

Bei systemischer Verabreichung in hohen Dosisbereichen zeigt Chlorpromazin photoirritative Potenz. Bei dermalen Applikation reagiert es jedoch wie ein Photoallergen. Ippen und Jung führen dieses Phänomen auf eine lichtabhängige Abspaltung des Chloratoms und der Bildung eines langlebigen Cl-Radikals zurück. Reagiert dies nun mit der DNA, folgt eine photoirritative Hyperpigmentierung (*Ippen et Jung, 1993*). Ippen fügt hinzu, daß die Hyperpigmentierung aber auch auf Wechselwirkungen mit Melanin oder dessen Vorstufen zurückzuführen sein kann. Bei topischer Anwendung setzt sich dieses durch Licht erzeugte Chlorpromazin-Radikal dagegen mit Hautproteinen um, die dann als Haptene, bzw. Antigene wirken.

Im Falle eines Landwirtes rief das Psychopharmakon Chlorpromazin eine persistierende Lichtüberempfindlichkeit hervor, die über den Zeitraum der Substanzexposition hinaus ging.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Retention des Photoallergens in der Haut über einen sehr langen Zeitraum. Dieses Phänomen wird auch als sog. „Bystander-Effekt“ beschrieben, der zu Reaktion gegen „kryptische Peptide“ führt. In der Haut werden unter UV-Wirkung und bei starken inflammatorischen Reaktionen Peptide zu sog. „kryptischen Peptiden“ verändert. Diese ursprünglich körpereigenen Peptide werden als fremd erkannt und lösen eine Immunreaktion aus, die zur Selektion hochaffiner T-Zellen führt und somit Kreuzreaktionen hervorrufen können.

1.6 Fragestellung und Ziele

Ziele dieser Arbeit waren die Entwicklung und Etablierung eines neuen *in vivo* Modells zur Detektion und erstmals auch zur Differenzierung photoirritativer und photoallergischer Substanzen.

Die Substanzgruppe der Flour-Chinolone sollte einer phototoxikologischen Risikoanalyse unterzogen werden und Aufschluß über die klinische Aussagekraft des IMDS-Modells bezüglich des photoirritativen Potentials der jeweiligen Substanz geben.

Obwohl bereits eine Anzahl von Ergebnissen *in vitro* et *in vivo* Tests vorliegen, sind viel Bausteine und Zusammenhänge in dem komplexen immunologischen Netzwerk der Haut noch weitestgehend unklar. Vor allem die differentiellen pathophysiologischen Vorgänge, die zur Genese photoallergischer und photoirritativer Reaktionen führen, sind trotz der hohen klinischen Inzidenz nur lückenhaft entschlüsselt.

Ungeachtet dieser unklaren Bausteine gibt es unterschiedliche zelluläre und morphologische Charakteristika photoallergischer und photoirritativer Reaktionsweisen, wie die Lymphknotenproliferation und die Ohrdickenzunahme. Die Untersuchungen sollen Aufschluß über die Zuverlässigkeit, Aussagekraft und Differenzierungsmöglichkeiten anhand dieser Parameter geben.

Die Analyse der zellulären und molekularen Interaktionen zwischen dem primären Reaktionsort Haut und den lokal drainierenden Lymphknoten soll mechanistisch-regulatorische Unterschiede zwischen photoallergischen und photoirritativen Reaktionen untersuchen.

Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Maturation und das Migrationsverhalten antigenpräsentierender Zellen aus der Haut in die lokal drainierenden Lymphknoten und die resultierende T-Zell- und assoziierte B-Zellaktivierung in den Lymphknoten gelegt. Die zellulären Ereignisse wurden nach der Isolierung der Zellen aus der Epidermis und den drainierenden Lymphknoten

anhand der Expression immunologisch relevanter Zelloberflächenmoleküle
flowzytometrisch untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden weibliche, pathogenfreie NMRI-Mäuse (Winkelmann, Borken) in einem Alter zwischen 6-12 Wochen und einem Gewicht von 28 bis 32g verwendet. Die Versuchstiere erhielten eine Standarddiät (Altromin GmbH, Lage) sowie Wasser *ad libitum*. Die Tiere wurden nach den Bestimmungen der Neufassung des deutschen Tierschutzgesetzes (*Bundesgesetzblatt Teil I, 1998*) in den Tierställen des immuntoxikologischen Labors (Bayer AG, Wuppertal) gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse mindestens eine Woche an die neue, UV-freie Umgebung akklimatisiert.

2.2 Applikationssubstanzen

8-Methoxypsoralen	(Sigma, Deisenhofen)
Acridin	(Sigma, Deisenhofen)
BAY-Y-3118	(Bayer, Wuppertal)
Chlorpromazin	(Sigma, Deisenhofen)
Ciprofloxacin	(Bayer, Wuppertal)
Enoxacin	(Sigma, Deisenhofen)
Lomefloxacin	(Sigma, Deisenhofen)
Nalidixinsäure	(Sigma, Deisenhofen)
Norfloxacin	(Sigma, Deisenhofen)
Ofloxacin	(Bayer, Wuppertal)
Olaquinox	(Gebachem, Leverkusen)
Promethazin	(Sigma, Deisenhofen)
Sparfloxacin	(Bayer, Wuppertal)

Die Applikationssubstanzen wurden unmittelbar vor Gebrauch in Aqua bidest bei oraler Applikation und in DAE 433 (*Maurer, 1984*) gelöst.

Die Substanzkonzentrationen sind jeweils im Ergebnisteil angegeben.

2.3 Verbrauchskemikalien

Alle Verbrauchskemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Roche Diagnostics (Mannheim), Merck (Darmstadt) und Sigm-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

FCS	Fetal Calf Serum
PBS ⁺⁺	Dulbecco`s Phospate Buffered Saline
PBS-Azid	PBS w/o + 0,02% (w/v) NaN ₃
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Siebe (70µm)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Trypsin	Trypsin
Varipette 4710	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg

2.4 Antikörper

Die folgenden monoklonalen Antikörper (mAk) wurden verwendet:

Hamster anti-Maus CD11c (HL3) (FITC) (IgG2a)	(Pharmingen; San Diego, USA)
Hamster anti-Maus CD54 (3E2) (FITC) (IgG)	(Pharmingen; San Diego, USA)
Hamster anti-Maus CD80 (GL1) (FITC) (IgG2a)	(Pharmingen; San Diego, USA)
Ratte anti-Maus CD11b (M1/70) (PE) (IgG2a) mAk	(Pharmingen; San Diego, USA)
Ratte anti-Maus CD25 (AMT-13) (FITC) (IgG2a) mAk	(Boehringer, Mannheim)
Ratte anti-Maus CD45/B220 (RA3-6B2) (FITC) (IgG2a) mAk	(Pharmingen; San Diego, USA)
Ratte anti-Maus CD86 (Ly-2GL1) (FITC) (IgG2a) mAk	(Pharmingen; San Diego, USA)
Ratte anti-Maus CD8a (Ly-2) (53-6.7) (PE) (IgG2a) mAk	(Pharmingen; San Diego, USA)

Ratte anti-Maus I-A (M5/114) (PE) (IgG2b) mAk
(Boehringer, Mannheim)

Ratte anti-Maus L3T4/CD4 (H129.19) (PE) (IgG2a) mAk
(Boehringer, Mannheim)

Isotyp- Kontrollen:

PE-konjugiertes Ratte IgG2a	(R35-95)	(Pharmingen; San Diego, USA)
PE-konjugiertes Ratte IgG2b	(R35-38)	(Pharmingen; San Diego, USA)
FITC-konjugiertes Ratte IgG1	(R3-34)	(Pharmingen; San Diego, USA)
FITC-konjugiertes Ratte IgG2a	(R35-95)	(Pharmingen; San Diego, USA)
FITC-konjugiertes Ratte IgG2b	(R35-38)	(Pharmingen; San Diego, USA)
FITC-konjugiertes Hamster IgG	(UC8-4B3)	(Pharmingen; San Diego, USA)

2.5 Geräte

Analysenwaage	(Typ R 160 P Sartorius, Göttingen)
Coulter Coulter ZM	(Biometra, Göttingen)
FACScan	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Flow	(Modell BSB 3A, Galaire, Opera, Italien)
Haut-Dickenmesser	(ODI 001 TG, Kroeplin, Schlüchtern)
Mikroskop	(Modell Standard 14, Carl Zeiss, Oberkochen)
Pipettierhilfen	(Accuboy, Tecnomara, Zürich, Schweiz)
Zentrifuge	(Minifuge, Heraeus, Düsseldorf)

2.6 Applikationsansätze

Für die dermale Behandlung wurde die jeweilige Substanz in den speziell angegebenen Konzentrationen unmittelbar vor Gebrauch in DAE 433 gelöst.

Die oral zu applizierenden Substanzen wurden alle, bis auf 8-MOP, in *Aqua Bidest* gelöst. Nach den Erfordernissen des Löslichkeitsverhaltens der jeweiligen Substanz wurde auf maximal 10ml/kgKG Lösung verdünnt. 8-MOP wurde in einer 50%-igen DMSO-Lösung angesetzt.

2.7 Behandlungsprotokoll zur Induktion der Primärantwort bei lokal applizierten Substanzen

Für die Untersuchung der Primärantwort im Rahmen des IMDS-Modells wurde weiblichen NMRI-Mäusen (n=5) die jeweilige Substanz bzw. das Vehikel (Volumen: 25µl/Ohr) an drei aufeinanderfolgenden Tagen auf den dorsalen Oberflächen beider Ohren appliziert.

Direkt nach der Behandlung wurden die Versuchstiere mit 10 bzw. 20 J/cm² UV-A Ganzkörper bestrahlt (Xenon UV Lampe mit Hönle H1 UV Filter; ca. 40 cm Bestrahlungsabstand; Emissionsspitze bei 365 nm; Bestrahlungsintensität 4,5 mW/cm². Die genaue Positionierung und Bestrahlungszeit wurde vor jeder Bestrahlung anhand eines Dosimeters überprüft).

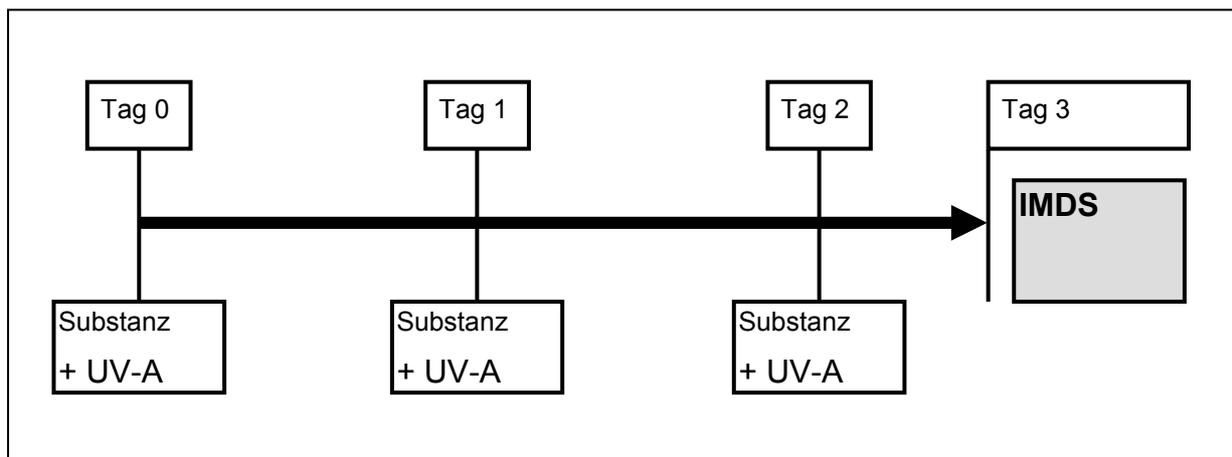


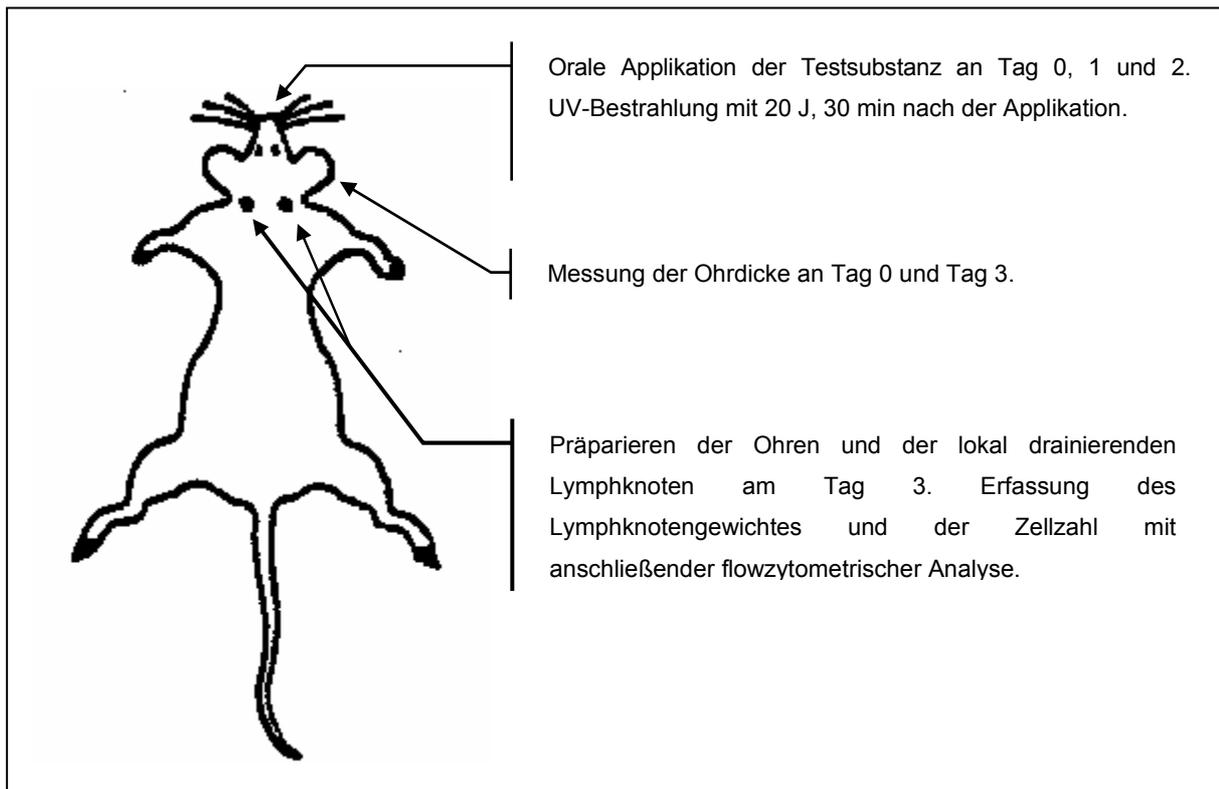
Abb. 2: Behandlungsschema des IMDS-Modells zur Induktion der Primärantwort bei epikutan und oral applizierten Substanzen

Vor der ersten Behandlung und 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurde die Dicke jedes Ohres an seinem helikalen Rand anhand des Odimeters ermittelt.

Am vierten Tag wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet. Die Ohren, sowie die aurikulären Lymphknoten am Treffpunkt der *V. facialis* und der *V. maxillaris* wurden resiziert.

2.8 Behandlungsprotokoll zur Induktion der Primärantwort bei oral applizierten Substanzen

Die orale Applikation der Substanz, bzw. des Vehikels erfolgte mittels einer speziellen Maus-Schlundsonde.



2.9 Berechnung der Zunahme der Ohrdicke

Die Zunahme der Ohrdicke wurde für jede Behandlungsgruppe als Differenz der arithmetischen Mittelwerte der Einzeltiermessungen unmittelbar vor dem Abtöten (Mw_2) der Mäuse zur Messung vor der ersten Substanzapplikation (Mw_1) angegeben.

$$\text{Ohrdickenzunahme} = \text{Mittelwert}_{\text{Substanzgruppe}} - \text{Mittelwert}_{\text{Kontrollgruppe}}$$

2.10 Wägung der Lymphknoten und Bestimmung der Zellzahl

Die aurikulären Lymphknoten wurden sofort nach der Entnahme von Geweberesten befreit, auf Kulturplatten in RPMI-Medium paarweise pro Tier auf Eis gelagert. Das Gewicht der auf Filterpapier abgetropften Lymphknoten wurde in Form von Einzeltiermessungen mit einer Analysenwaage AT261 (Mettler, Giessen) bestimmt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde durch mechanische Disaggregation (Pinzette) eine Zellsuspension in 1ml RPMI-Medium hergestellt und die bindegewebige Organkapsel entfernt.

Die Zellzahlen der einzelnen Lymphknotenpaare wurden konduktrometrisch mit einem Partikelzählgerät Z1 (Coulter, Krefeld) bestimmt. Dazu wurden 40 μl Einzellzellsuspension in 20 ml Isoton II (Coulter) (Verhältnis 1:500) gegeben und 1 min vor der Messung mit 20 μl Zapoglobin (Coulter) zur Erythrozytenlyse versetzt. Alle Partikel $\leq 4,43 \mu\text{m}$ wurden durch die Geräteeinstellung von der Messung ausgeschlossen.

2.11 Berechnung des Lymphknoten-Stimulationsindex

Der Lymphknoten-Stimulationsindex (LLN-Index) wurde sowohl für die Zunahme des Lymphknoten-Gewichts als auch der Lymphknotenzellzahl bestimmt: Er ist definiert als der Quotient der arithmetischen Mittelwerte der Einzeltiermessungen aus substanzbehandelter (Mittelwert_{Substanzgruppe}) und vehikelbehandelter (Mittelwert_{Kontrollgruppe}) Versuchsgruppe (Vohr *et al.*, 1994).

$$\text{LK-Zellzahlindex} = \frac{\text{Mittelwert}_{\text{Substanzgruppe}}}{\text{Mittelwert}_{\text{Kontrollgruppe}}}$$

Aus dieser Definition folgt, daß sich für die vehikelbehandelte Versuchsgruppe immer ein LLN-Index von eins ergibt.

2.12 Berechnung des IMDS-Differenzierungsindex

Mit Hilfe des "Integrated Model for the Differentiation of chemical-induced allergic and irritant Skin reactions" (IMDS) läßt sich das photo-/ irritative, bzw. photo-/ sensibilisierende Potential einer applizierten Substanz zuverlässig abschätzen (Homey *et al.*, 1998).

Dem IMDS-Modell liegt die Hypothese zugrunde, daß eine sensibilisierende Substanz während der Induktionsphase der Reaktion nur eine schwache inflammatorische Reaktion an der Applikationsstelle, aber eine deutliche antigenabhängige Zellproliferation der drainierenden Lymphknoten verursacht. Im Gegensatz hierzu löst eine irritative Substanz eine starke inflammatorische Reaktion an der Applikationsstelle, aber aufgrund der unspezifischen Aktivierung durch pro-inflammatorische Zytokine nur eine schwache Zellproliferation der drainierenden Lymphknoten aus.

Der IMDS-Differenzierungsindex (DI) als Quotient aus relativer Lymphknotenproliferation ($P_{[\%]}$ = % einer definierten maximalen Proliferation) und relativer Ohrdickenzunahme ($O_{[\%]}$ = % einer definierten maximalen

Ohrdickenzunahme) ermöglicht eine Abschätzung, ob es sich um eine Substanz mit einem irritativen oder sensibilisierendem Potential handelt:

$$P_{[\%]} = \left(\frac{\text{LK} - \text{Zellzahlindex} - 1}{4} \right) \times 100$$

$$O_{[x]} = \left(\frac{\text{Ohrdickenzunahme} \times 10^{-2} \text{ mm}}{15 \times 10^{-2} \text{ mm}} \right) \times 100$$

$$DI = \frac{P_{[\%]}}{O_{[x]}}$$

Abb. 4: Die Berechnung des IMDS-Differenzierungsquotienten

Die zur Berechnung verwendeten Maximalwerte wurden aufgrund historischer Daten festgelegt. Aufgrund der ebenfalls anhand historischer Daten ermittelten Schwankungen der Ohrdicken innerhalb einer Behandlungsgruppe wurden Ohrdickenzunahmen $\leq 1 \times 10^{-2}$ mm und Lymphknoten-Stimulationsindices $\leq 1,25$ auf einen Grundwert von 6 % gesetzt. Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Definition ergibt sich für einen $DI \geq 1$ ein photo-/irritatives Potential, für einen $DI \geq 0$ aber ≤ 1 ein photo-/allergisches Potential der verwendeten Substanz.

2.13 Herstellung einer Epidermis-Zellsuspension

Nach dem Abtöten der Mäuse wurden die Ohren in RPMI-Medium auf Eis gelagert. Die Cutis wurde von ihrer knorpeligen Auflagefläche abpräpariert. Nach einer 30-minütigen Trypsinisierung (0,5%-iges Trypsin) wurde die Epidermis von der Dermis in einem 0,05%-igen Trypsinbad mit Pinzetten gelöst. Anschließend wurde durch 10-maliges resuspendieren eine Epidermis-Zellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit 10%-igem FCS gewaschen und in 2ml PBS w/o bei 4°C aufbewahrt.

2.14 Durchflußzytometrische Analysen

Zur Durchführung der Analysen der Zelloberflächenproteine wurden ein FACScan-Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg) und ein FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) genutzt.

Dazu wurden 1×10^6 Zellen pro Gruppe mit 200 μ l Antikörperlösung (in 0,02%ige NaN_3 - Lsg.) für 15 Minuten inkubiert, gewaschen und der Analyse des FACScan zugeführt.

Pro Messung wurden 10.000 Zellen nach Größe, Granularität und Fluoreszenzmerkmalen analysiert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Cell Quest (Becton Dickinson).

2.15 Statistik

Bei der statistischen Auswertung der Experimente bezüglich der Proliferation der Lymphknotenzellzahl und der Ohrdickenzunahme wurde aus zusammengehörenden Einzelwerten der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Die Errechnung der Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels des Student-t-Tests durchgeführt ($p < 0,05$).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des IMDS-Modells zur prädiktiven Erfassung photoallergischer und photoirritativer Substanzen

Die folgenden Versuche dienten dem Ziel, das IMDS-Modell für die Testung photoallergischer und photoirritativer Substanzen zu prüfen. Hierbei sollte die Fragestellung untersucht werden, ob Substanzen nach oraler Applikation und UV-Bestrahlung als photoallergisch oder photoirritativ zu detektieren sind.

Ein besonderer Schwerpunkt wurde hierbei auf die Differenzierung zwischen photoallergischen und photoirritativen Substanzen gelegt.

8-Methoxypsoralen (8-MOP) wurde als eine von der COLIPA empfohlene Referenzsubstanz zur Auslösung photoirritativer und Olaquinox zur Auslösung photoallergischer Reaktionen verwendet.

Als Bezugsgruppen dienten in allen Versuchen vehikelbehandelte Kontrollgruppen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die orale Applikation des Vehikels Aqua bidest und Bestrahlungseinheiten von 10, bzw. 20 Joule/cm² an drei aufeinanderfolgenden Tagen weder eine inflammatorische Hautreaktion (Zunahme der Ohrdicke), noch einer Aktivierung der drainierenden Lymphknoten (erhöhtes Lymphknoten-Gewicht, bzw. –Zellzahl) induzierte (Tab. 1).

oral	Ohrdickenzunahme in mm ⁻²	Lymphknotengewicht in mg	LK-Zellzahl [x 10 ³ /ml]
Vehikel	0,2 ± 0,14	7,19 ± 1,04	8973,0 ± 3063,5
10 Joule/ cm ²	0,4 ± 0,20	6,49 ± 0,99	8066,1 ± 2123,6
20 Joule/ cm ²	0,2 ± 0,11	6,59 ± 1,39	8685,9 ± 2712,5

Tab. 1: Einfluß der Applikation des Vehikels Aqua bidest und Bestrahlungseinheiten von 10 und 20 Joule/ cm² auf die Ohrdicke, das Lymphknotengewicht und die Lymphknotenzellzahl

An drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0, 1, 2) wurde fünf NMRI- Mäusen pro Gruppe das Vehikel Aqua bidest mittels einer Schlundsonde oral appliziert. Nach einer systemischen Verteilungszeit von 30 min wurden die Mäuse mit 10 J/ cm², bzw. 20 J/ cm² UV-A bestrahlt. Die Ohrdicken wurden vor der ersten und 24 h nach der letzten Behandlungseinheit (Tag 4) ermittelt und der Grad der Hautentzündung als Funktion der Ohrdickenzunahme beschrieben. Am Tag 4 wurden die lokal drainierenden Lymphknoten entfernt, das Gewicht und die Lymphknotenzellzahl der gepoolten Lymphknoten eines Tieres ermittelt und die Mittelwerte einer Gruppe berechnet (Mittelwerte ± Standardabweichung). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den Kontrollgruppen, die auf der Basis der Einzeltierwerte errechnet wurden, sind mit „*“ markiert.

Wie auch in anderen Arbeitsgruppen (*Kimber et Weisenberger, 1989; Spielmann et al., 1993; Vohr et al., 1994*) zeigten Vorversuche, daß eine optimale Sensibilisierung gegenüber Kontaktallergenen durch einmalige topische Applikation der jeweiligen Testsubstanz an drei aufeinanderfolgenden Tagen erzielt werden kann.

Die Zellproliferation der drainierenden Lymphknoten der Haut erreichte bei diesem Applikationsschema ein reproduzierbares Maximum am Tag drei und vier (*Kimber et al., 1994*).

Da es sich bei photoallergischen Reaktionen um eine Sonderform der Kontaktallergie handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit dieses viertägige Versuchsprotokoll sowohl zur Induktion photoallergischer als auch photoirritativer Reaktionen verwendet. Anhand der immunologischen Endpunkte Ohrdicken- und Lymphknotenzellzahlzunahme wurde der IMDS-Quotient für alle untersuchten Substanzen errechnet.

3.1.1 Der photoirritative Standard 8-Methoxypsoralen im IMDS-Modell

Der IMDS-Differenzierungsindex (DI) ermöglicht auf mathematischer Basis eine objektive Differenzierung zwischen photoallergischen und photoirritativen Reaktionsformen einer Substanz in der jeweilig angewandten Konzentration.

Ausgehend von der Beobachtung, daß sowohl Photoallergene als auch Photoirritantien eine signifikante Zellproliferation der drainierenden Lymphknoten induzieren, aber nur letztere eine signifikante inflammatorische Hautreaktion verursachen, wird das relative Verhältnis zwischen beiden objektiv meßbaren Parametern bestimmt.

Ein $DI > 1$ entspricht einem allergischen Potential, wohingegen ein $DI < 1$ ein irritatives Potential anzeigt (*Homey et al., 1998*).

Die Berechnung des IMDS-DI ist jedoch nur für positive Reaktionen einer Testsubstanz sinnvoll. Positive Reaktionen werden als Zunahme der Ohrdicke von mindestens $2 \times 0,01\text{mm}$ oder positive Lymphknotenreaktionen als ein Lymphknotenzellzahlinde größer als 1,25 definiert.

In Tab. 2 sind die Parameter Ohrdickenzunahme und Verhalten der LK-Zellzahl nach oraler Applikation von 10 mg/kgKG 8-MOP und nachfolgender Bestrahlung mit 10 Joule UV-A/ cm^2 dargestellt. An Versuchstag drei war eine massive Entzündungsreaktion der Haut zu verzeichnen.

Der Mittelwert der Ohrdickenzunahme betrug $15,5 \text{ mm}^2$ und belegt damit eine Zunahme der Ohrdicke um mehr als 103%. Im Verhältnis zu dieser starken Reaktion in der Haut zeigten die lokal drainierenden Lymphknoten nur eine geringe Lymknotenproliferation (LK-Zellzahlinde: 2,32).

oral	Ohrdickenzunahme [mm ⁻²]	LK-Zellzahlindex
10 mg 8-MOP/kgKG	15,5* ± 8,73	2,32

Tab. 2: Die Errechnung des IMDS-Quotienten am Beispiel von 8-Methoxypsoralen

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde fünf NMRI Mäusen pro Gruppe 10 mg/kgKG 8-Methoxypsoralen oder das Vehikel DMSO oral appliziert. Nach einer systemischen Verteilungszeit von 30 min wurden die Mäuse mit 10 J/cm² UV-A bestrahlt. Die Ohrdicken wurden vor der ersten und 24 h nach der letzten Behandlungseinheit ermittelt und der Grad der Hautentzündung als Funktion der Ohrdickenzunahme beschrieben. Am Tag 4 wurden die lokal drainierenden Lymphknoten entfernt, das Gewicht und die Lymphknotenzellzahl der gepoolten Lymphknoten eines Tieres ermittelt und die Mittelwerte einer Gruppe berechnet (Mittelwerte ± Standardabweichung). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den Kontrollgruppen, die auf der Basis der Einzeltierwerte errechnet wurden, sind mit „*“ markiert.

Für die, aus der Tabellen 2 entnommenen Werte für die Ohrdickenzunahme und Lymphknotenproliferation errechnet sich der IMDS-Quotient wie folgt:

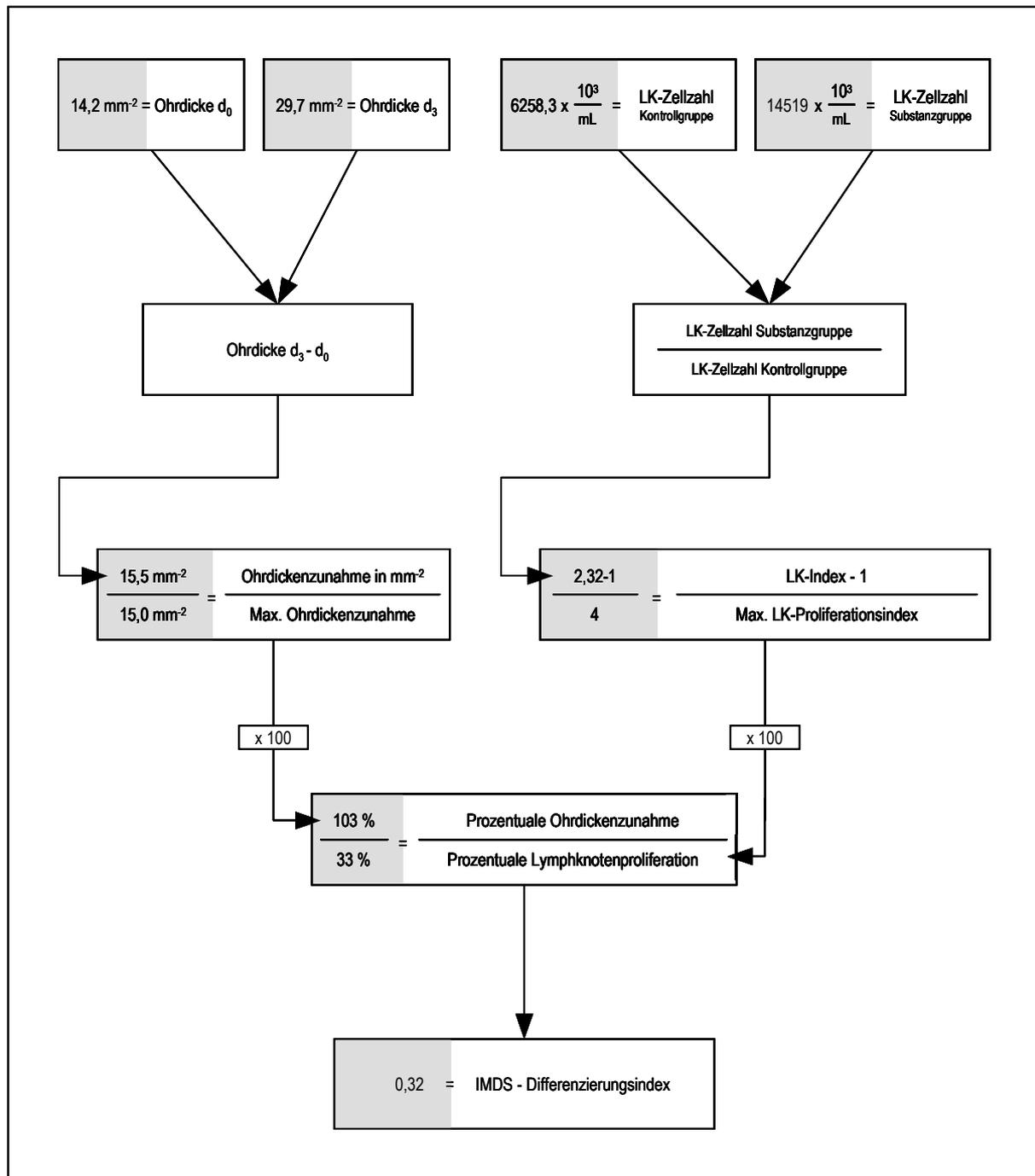


Abb. 5: Berechnung des IMDS-DI am Beispiel von 8-MOP

3.1.2 Etablierung des IMDS-Modells für photoirritative Substanzen anhand der Kinetik von 8-MOP

Die Untersuchungen zur Kinetik von 8-Methoxypsoralen an den Tagen vier, fünf, sieben und neun sollte klären, ob das Behandlungsprotokoll des IMDS-Modells zur Auslösung photoirritativer Reaktionen geeignet ist und Tag drei repräsentativ für eine photoirritative Reaktionen ist. An den Tagen vier bis sieben zeigte sich eine weitere signifikante Zunahme der Ohrdicke, wobei die Lymphknotenzellzahl erst ab Tag fünf signifikant anstieg.

Schilling et al. fanden bei Untersuchungen mit Crotonöl heraus, daß im Rahmen irritativer Reaktionen die prozentuale Proliferation der Lymphknotenzellzahl ab Tag sieben der prozentualen Zunahme Ohrdicke überwiegt. Damit wäre zu diesem Zeitpunkt ein Umschlagen des IMDS-Differenzierungsquotienten von einer irritativen Reaktion in eine allergische zu beobachten (*Diplomarbeit, C. von Schilling, 2000*).

Die Kinetik von 8-MOP zeigt, daß diese Beobachtung nicht uneingeschränkt auf photoirritative Substanzen übertragbar ist. An allen Versuchstagen zeigt 8-MOP einen Differenzierungsquotienten kleiner eins und damit ein photoirritatives Potential. Zu beobachten ist jedoch eine kontinuierliche Zunahme der Lymphknotenzellzahl und ein Rückgang der Ohrdickenzunahme am Tag neun. Die immunologischen Endpunkte einer Photoirritation werden hierdurch verwischt.

Versuche zu der Kinetik von Sparfloxacin und Lomefloxacin führten zu vergleichbaren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

Da dieses Phänomen bekannt ist, sollte der Tag der Aufarbeitung nicht zu weit nach hinten verschoben werden, weil zu späteren Terminen Substanzen mit photo-/allergischem Potential bereits eine Memory-T-Zellbildung induziert haben könnten. Memory-T-Zellen infiltrieren die Haut und führen bei erneutem Kontakt zu massiven Hautreaktionen. Auf dieser Reaktion beruht der Nachweis von sensibilisierenden Substanzen im sogenannten Mouse Ear Swelling Test (MEST).

Der Parameter Ohrdickenzunahme im IMDS-Modell repräsentiert die Entzündungsreaktion nach Photo-/Irritation. Im MEST (Mouse Ear Swelling Test) bestätigt die Ohrdickenzunahme hingegen den photo-/allergischen Charakter der Substanz, da diese durch die Infiltration spezifischer T-Zellen zu Stande kommt.

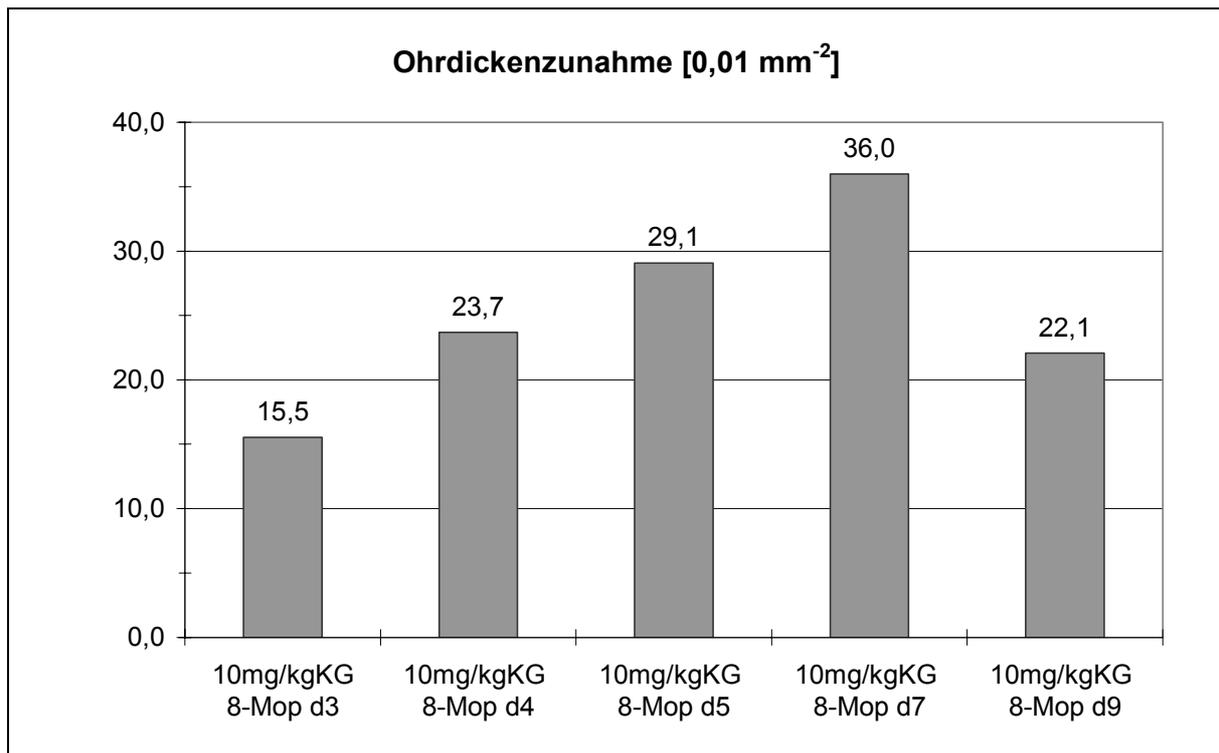


Abb. 6: Kinetischer Verlauf photoirritativer Reaktionen: Lokale Entzündungsreaktion der Haut
An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden fünf NMRI Mäusen pro Gruppe 10, bzw. 50 mg/kgKG 8-Methoxapsoralen oder das Vehikel DMSO oral appliziert. Nach einer systemischen Verteilungszeit von 30 min wurden die Mäuse mit 10 J/cm² UV-A bestrahlt. Die Ohrdicken wurden vor der ersten, 24 h nach der letzten Behandlungseinheit sowie an den jeweiligen Aufarbeitungstagen bestimmt.

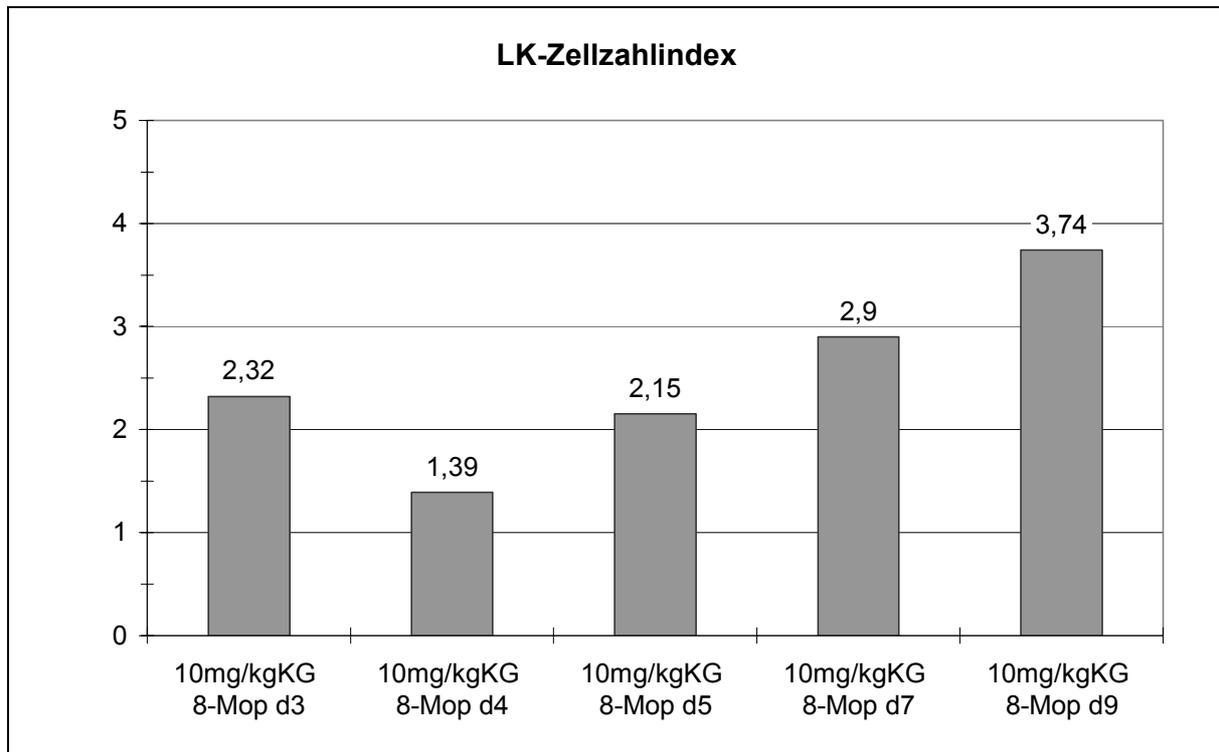


Abb. 7: Kinetischer Verlauf photoirritativer Reaktionen: Zellproliferation im lokal drainierenden Lymphknoten

Abb. 4: Der kinetische Verlauf einer photoirritativen Reaktion, gemessen an den Tagen d3, d4, d5, d7 und d9. Das Behandlungsprotokoll entspricht dem von Abb. 3. Am d3 wurden die lokal drainierenden Lymphknoten beider Ohren entfernt und die Zellzahl der gepoolten Lymphknoten eines Tieres ermittelt. Der LLN-Index zeigt den Grad der Lymphknotenproliferation am d3, 4, 5, 7 bzw. 9 als Faktor x im Verhältnis zur jeweiligen Kontrollgruppe an. (Mittelwerte \pm Standardabweichung; Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zu den Kontrollgruppen, die auf der Basis der Einzeltierwerte errechnet wurden sind mit „*“ markiert.

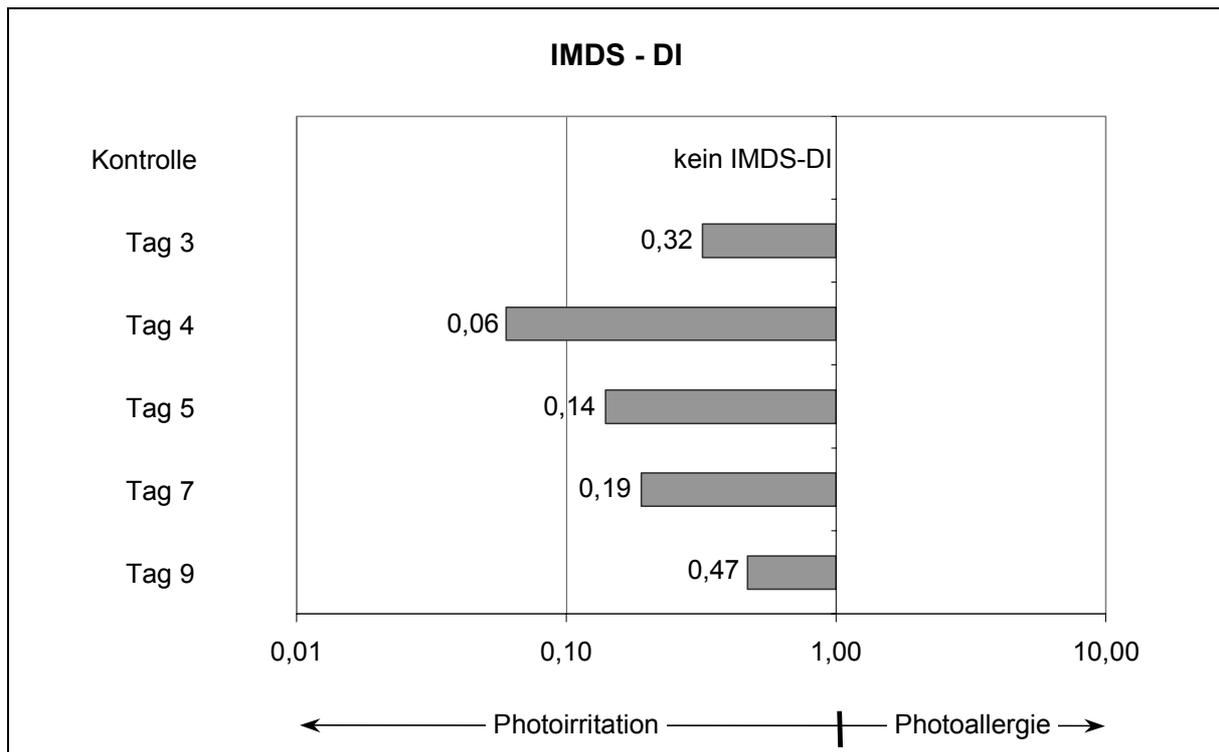


Abb. 8: IMDS-Quotient auf der Basis der Kinetik von 8-MOP

Der kinetische Verlauf einer photoirritativen Reaktion, gemessen an den Tagen d3, d4, d5, d7 und d9. Das Behandlungsprotokoll entspricht dem der Abb. 3. Der IMDS-Differenzierungsindex (DI) wurde als Quotient aus relativer Lymphknotenproliferation ($P_{[%]}$ = % einer definierten maximalen Proliferation) und relativer Ohrdickenzunahme ($O_{[%]}$ = % einer definierten maximalen Ohrdickenzunahme) berechnet.

3.1.3 Der photoallergische Standard Olaquinox im IMDS-Modell

Im Gegensatz zu 8-Methoxypsoralen wiesen Versuche mit Olaquinox (Bsp.: 25 mg/kgKG) eine wesentlich stärkere Proliferation (LK-Zellzahlindex von 4,55) der lokal drainierenden Lymphknoten am Tag 3 bei vergleichsweise sehr geringer Ohrdickenzunahme ($0,4 \text{ mm}^{-2}$) auf. Der daraus resultierende IMDS-DI betrug 34,13 und lag damit eindeutig im Bereich der Photoallergie. Gleiches gilt für die Konzentrationen 5 und 50 mg/kgKG. Die Kontrollgruppen zeigten weder eine Ohrdickenzunahme noch eine Lymphknotenproliferation.

Um bei Olaquinox etwaige UV-Licht unabhängige Nebeneffekte auszuschließen, wurde einer weiteren Gruppe 50 mg/kgKG Olaquinox appliziert und die jeweilige Bestrahlungseinheit ausgelassen.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei einer Substanzkonzentration von 50 mg/kgKG ohne UV-Exposition weder eine Lymphknotenzellproliferation noch eine Ohrdickenzunahme zu detektieren waren und es sich bei der Substanz Olaquinox um eine UV-spezifische Reaktion handelt. Die Ohrdicke zeigte bei dieser Konzentration ein Abnahme marginale um 0,2 in mm^{-2} , welche im Bereich der normalen Standardabweichung liegt. Der Lymphknotenzellzahlindex unterschied sich bei einem Faktor von 1,01 nicht von der Kontrollgruppe.

oral	Ohrdickenzunahme [mm^{-2}]	LK-Zellzahlindex	IMDS-DI
5 mg/kgKG OLAQ + UV-A	0,2 $\pm 0,48$	1,82*	15,76
25 mg/kgKG OLAQ + UV-A	0,4 $\pm 0,23$	4,55*	34,13
50 mg/kgKG OLAQ + UV-A	0,5 $\pm 0,28$	4,38*	25,6
50 mg/kgKG OLAQ – UV-A	-0,2 $\pm 0,45$	1,01	Kein IMDS-DI

Tab.3: Dosis-Wirkungsbeziehung der Ohrdickenzunahme, der Lymphknotenzellproliferation und des IMDS-DI während der Induktionsphase photoallergischer Reaktionen

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden jeweils 5 NMRI Mäuse pro Gruppe 5, 25, 50 mg/kgKG bzw., das Vehikel Aqua bidest oral appliziert. Nach einer systemischen Verteilungszeit von 30 min wurden die Mäuse mit 10 J/cm^2 UV-A bestrahlt. Eine Gruppe wurde mit 50 mg/kgKG Olaquinox behandelt und nicht bestrahlt. 24 h nach der letzten Behandlungseinheit wurden die aurikulären Lymphknoten (LK) präpariert und die Zellzahl der paarigen LK bestimmt. Die Ohrdicken wurden vor der ersten und 24 h nach der letzten Behandlungseinheit ermittelt. (Mittelwerte \pm Standardabweichung; Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zu den Kontrollgruppen, die auf der Basis der Einzeltierwerte errechnet wurden, sind mit „*“ markiert. Aus den auf den arithmetischen Mittelwerten der Versuchsgruppen beruhenden Ohrdickenzunahmen und den Stimulations-Indizes (Zellzahl) wurden die jeweiligen IMDS-Differenzierungsindices (DI) berechnet. „Kein IMDS-DI“ zeigt an, daß die Ohrdickenzunahme und/ oder die Lymphknotenzellzahlproliferation unterhalb der festgesetzten positiven Level lagen. Beträgt die Ohrdickenzunahme $\leq 1 \times 10^{-2} \text{ mm}$ und / oder der Lymphknoten-Stimulationsindex $\leq 1,25$ auf der Basis der Ergebnisse der Kontrollgruppen, kann kein IMDS-DI für die jeweilige Substanzkonzentration errechnet werden.

3.2 Flour-Chinolone im IMDS-Modell

Flour-Chinolone sind als photoreaktive Stoffe bekannt. Ihre Nebenwirkungen im Sinne photoirritativer und teilweise photoallergischer Reaktionen nach oraler Applikation wurden klinisch vielfach beobachtet.

Da es derzeit weder Testverfahren zur Detektion photoirritativer noch photoallergischer Nebenwirkungen nach oraler Applikation gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals der Versuch unternommen, das photoirritative Potential dieser Substanzen nach oraler Aufnahme nachzuweisen. Mit den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob das photoirritative Potential der einzelnen Substanzen zu detektieren ist und ob eine Abstufung zwischen den verschiedenen Substanzen bezüglich ihrer photoirritativen Potenz möglich ist.

3.2.1 Die photoirritative Substanz Sparfloxacin im IMDS-Modell

Sparfloxacin gilt als photoirritative Referenzsubstanz aus der Gruppe der Flour-Chinolone.

Behandlungen von Sparfloxacin + UV-A in den Konzentrationsstufen 100, 200 und 400 mg/kgKG induzierten eine dosisabhängige und stark ausgeprägte Ohrdickenzunahme im Sinne einer lokalen Entzündungsreaktion der Haut. Begleitet wurde diese Reaktionen von einer moderaten Zunahme der Lymphknotenzellzahl im lokal drainierenden Lymphknoten. Eine signifikante Zunahme der Ohrdicke als Maß der Entzündungsreaktion der Haut wurde bei einer Konzentration ab 100 mg/kgKG gefunden, ein signifikanter Anstieg der Lymphknotenzellzahl jedoch erst bei einer Konzentration von 400 mg/kgKG.

In allen Versuchen korrelierten Lymphknotengewicht und Lymphknotenzellzahl direkt miteinander. Es zeigte sich, daß die Lymphknotenzellzahl als Maß für die Lymphknotenproliferation die Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppen deutlicher darstellt (Tab.4).

oral	Ohrdickenzunahme [in mm ⁻²]	LK-Gewicht [mg]	LK-Zellzahl [x 10 ³ /ml]
Kontrolle	-0,25 ±1,27	6,88 ±1,27	13.561,40 ±7.246,80
100 mg SPA/kg KG	6,40* ±2,71	10,94 ±0,93	14.369,90 ±3.390,05
200 mg SPA/kg KG	13,30* ±9,14	10,58 ±2,72	15.521,00 ±4.616,73
400 mg SPA/kg KG	28,90* ±6,21	12,36* ±2,96	22.418,20* ±2.4820,99

Tab. 4: Dosis-Wirkungsbeziehung photoirritativer Reaktionen am Beispiel von Sparfloxacin

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden fünf NMRI Mäusen pro Gruppe 100, 200 oder 400 mg/kgKG Sparfloxacin oder das Vehikel (Aqua bidest) oral appliziert. Nach einer systemischen Verteilungszeit von 30 min wurden die Mäuse mit 10 J/cm² UV-A bestrahlt. 24 h nach der letzten Behandlungseinheit wurden die aurikulären Lymphknoten (LK) präpariert und das Gewicht und die Zellzahl der paarigen LK bestimmt. Die Ohrdicken wurden vor der ersten und Behandlung und unmittelbar vor dem Abtöten der Tiere, also 24 h nach der letzten Behandlungseinheit ermittelt. (Mittelwerte ± Standardabweichung; Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zu den Kontrollgruppen, die auf der Basis der Einzeltierwerte errechnet wurden, sind, mit „*“ markiert.

Der anhand der oben aufgeführten Ausgangsdaten errechnete IMDS-DI zeigte mit Werten zwischen 0,04 und 0,08 in den oben genannten Konzentrationsstufen ein photoirritatives Potential für Sparfloxacin an.

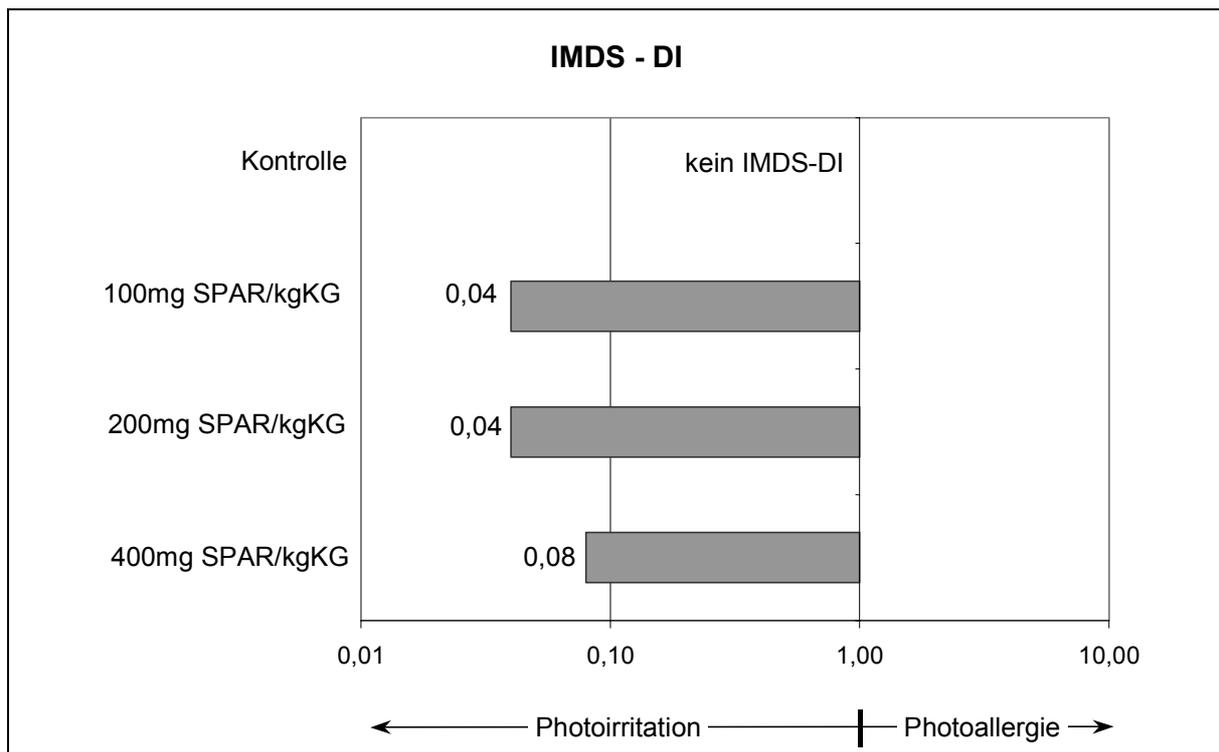


Abb. 9: Darstellung des IMDS-DI am Beispiel von Sparfloxacin in Abhängigkeit von der Konzentration

Der IMDS-Differenzierungsindex (DI) wurde als Quotient aus relativer Lymphknotenproliferation ($P_{[\%]}$ = % einer definierten maximalen Proliferation) und relativer Ohrdickenzunahme ($O_{[\%]}$ = % einer definierten maximalen Ohrdickenzunahme) berechnet. Die Versuchsanordnung ist identisch mit der in Tab 4.

Die Flour-Chinolone BAY-Y-3118 (5-50 mg/kgKG) und Lomefloxacin (400 -600 mg/kgKG) zeigten nach UV-Exposition ein vergleichbares konzentrationsabhängiges Reaktionsmuster wie Sparfloxacin. 50 mg/kgKG BAY-Y-3118 + UV-A erzeugte beispielsweise einen LK-Zellzahlindex von 2,3 und eine Ohrdickenzunahme von $26,6 \times 10^{-2}$ mm ($\hat{=}$ 177%).

Es konnte gezeigt werden, daß für BAY-Y-3118 und Lomefloxacin nach oraler Applikation unterschiedlicher Substanzkonzentrationen IMDS-Quotienten zwischen 0,04 und 0,37 errechnet wurden (Tab. 5) und damit alle untersuchten Konzentrationen photoirritativ im IMDS-Modell reagierten.

oral	Ohrdickenzunahme [mm x 10 ⁻²]	LK-Zellzahlindex	IMDS-DI
5mg/kgKG BAY-Y-3118	1,2 ±3,54	1,00	0,13
25mg/kgKG BAY-Y-3118	15,4* ±12,72	1,81	0,04
50 mg/kgKG BAY-Y-3118	26,6* ±8,23	2,3	0,18
400 mg/kgKG LOME	16,5* ±11,18	2,70	0,37
600 mg/kgKG LOME	21,2* ±7,53	2,13	0,21

Tab. 5: Dosis-Wirkungsbeziehung photoirritativer Reaktionen der Haut: BAY-Y-3118 und Lomefloxacin im IMDS-Modell

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden fünf NMRI Mäusen pro Gruppe 5, 25, bzw. 50 mg/kgKG BAY-Y-3118, bzw. 400, bzw. 600 mg/kgKG Lomefloxacin oder das Vehikel (Aqua bidest) oral appliziert. Nach einer systemischen Verteilungszeit von 30 min wurden die Mäuse mit 10 J/cm² UV-A bestrahlt. 24 h nach der letzten Behandlungseinheit wurden die aurikulären Lymphknoten (LK) präpariert und die Zellzahl der paarigen LK bestimmt. Die Ohrdicken wurden vor der ersten und 24h nach der letzten ermittelt. (Mittelwerte + Standardabweichung; Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den Kontrollgruppen, die auf der Basis der Einzeltierwerte errechnet wurden, sind mit „*“ markiert. Aus den auf den arithmetischen Mittelwerten der Versuchsgruppen beruhenden Ohrdickenzunahmen und den Stimulations-Indices (Zellzahl) wurden die jeweiligen IMDS-Differenzierungsindices (DI) berechnet.

3.2.2 Schwache Photoirritantien aus der Gruppe der Flour-Chinolone

Anhand der, in der Literatur als sehr schwach beschriebenen Photoirritantien Ciprofloxacin, Ofloxacin und Norfloxacin aus der Gruppe der Flour-Chinolone sollte die Sensitivität des IMDS-Modells geprüft werden.

Die Applikation von 4000 mg/kgKG zeigte für die Substanzen Ofloxacin und Ciprofloxacin ein eindeutig photoirritatives Potential mit einem IMDS-DI von 0,15 für Ciprofloxacin und 0,19 für Ofloxacin an. Bei Enoxacin (3000 mg/kgKG) waren eine Zunahme der Ohrdicke um 12,5 mm⁻² und ein LLN-Index von 1,37 zu verzeichnen. Der daraus resultierende IMDS-DI betrug 0,11.

Bei Norfloxacin hingegen konnten weder eine Proliferation der Lymphknoten noch eine Ohrdickenzunahme beobachtet werden (Tab. 6).

oral	Ohrdickenzunahme [mm x 10 ⁻²]	LK-Zellzahlindex	IMDS-DI
4g/kgKG CIPR	1,6 ±0,42	1,00	0,15
3g/kgKG ENOX	12,5* ±5,63	1,37	0,11
4g/kgKG NORF	0,0 ±0,35	1,00	Kein IMDS-DI
4g/kgKG OFLO	7,2* ±4,82	1,37	0,19

Tab. 6: Ciprofloxacin, Enoxacin, Norfloxacin und Ofloxacin im IMDS-Modell

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden fünf NMRI Mäusen pro Gruppe und fünf NMRI-Mäusen 4000 mg/kgKG Ofloxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin, 3000 mg/kgKG Enoxacin oder das Vehikel (Aqua bidest) oral appliziert. Nach einer systemischen Verteilungszeit von 30 min wurden die Mäuse mit 10 J/cm² UV-A bestrahlt. 24 h nach der letzten Behandlungseinheit wurden die aurikulären Lymphknoten (LK) präpariert und die Zellzahl der paarigen LK bestimmt. Die Ohrdicken wurden vor der ersten Behandlung und 24 h nach der letzten Behandlungseinheit ermittelt. (Mittelwerte ± Standardabweichung; Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den Kontrollgruppen, die auf der Basis der Einzeltierwerte errechnet wurden, sind mit „*“ markiert. Aus den auf den arithmetischen Mittelwerten der Versuchsgruppen beruhenden Ohrdickenzunahmen und den Stimulations-Indizes (Zellzahl) wurden die jeweiligen IMDS-Differenzierungsindices (DI) berechnet. „Kein IMDS-DI“ zeigt an, daß die Ohrdickenzunahme und/ oder die Lymphknoten-zellzahlproliferation unterhalb der festgesetzten positiven Level lagen. Beträgt die Ohrdickenzunahme $\leq 1 \times 10^{-2}$ mm und / oder der Lymphknoten-Stimulationsindex $\leq 1,25$ auf der Basis der Ergebnisse der Kontrollgruppen, kann kein IMDS-DI für die jeweilige Substanzkonzentration errechnet werden.

3.2.3 Flour-Chinolone mit photoallergischem Potential

In klinische Beschreibungen zeigt Enoxacin sowohl photoirritative als auch photoallergische Eigenschaften (*Kang et al., 1993*). Hierzu untersuchten wir Enoxacin in niedrigen Substanzkonzentrationen von 200, 400 und 800 mg/kgKG. Es zeigten sich keine oder nur diskrete Ohrdickenzunahmen mit Werten zwischen 0,1 und 1,7 mm².

Die Lymphknotenproliferation hingegen erbrachte Zellzahlindizes zwischen 1,64 und 2,3. Daraus ergab sich in den vorgestellten Substanzkonzentrationen jeweils ein photoallergisches Potential mit beispielsweise einem DI von 26,6 bei 200 mg/kgKG Enoxacin.

oral	Ohrdickenzunahme [mm x 10 ⁻²]	LK-Zellzahlindex	IMDS-DI
200 mg/kgKG ENOX	0,1 ±0,20	1,64	26,6
400 mg/kgKG ENOX	1,7 ±1,02	2,3	2,9
800 mg/kgKG ENOX	0,9 ±0,80	2,08*	4,5

Tab. 7: Enoxacin aus der Gruppe der Flour-Chinolone mit photoallergischem Potential

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden fünf NMRI Mäusen pro Gruppe 200, 400 und 800 mg/kgKG Enoxacin oder das Vehikel Aqua bidest (Gruppe 1) oral appliziert. Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 6.

Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob weitere Flour-Chinolone photoallergische Eigenschaften besitzen und diese teilweise nur durch das photoirritative Potential in höheren Substanzkonzentrationen überlagert werden und so primär nicht zum Ausdruck kommen.

Versuche mit 50, 100, 200, 400 und 800 mg/kgKG Ciprofloxacin, Ofloxacin Norfloxacin zeigten weder eine Lymphknotenschwellung noch ein Ohrdickenzunahme (Daten nicht gezeigt).

Im der Konzentrationsstufe 2000 mg/kgKG präsentierte Ofloxacin und Norfloxacin eine Proliferation der Lymphknoten (LLN-Indices zwischen 1,26 und 1,68) bei nur minimaler Zunahme der Ohrdicken zwischen 0,1 und 0,4 mm². Der errechnete IMDS-DI deutet damit auf ein photoallergisches Potential für die Flour-Chinolone Norfloxacin (11,4) und Ofloxacin (25,7) in der Konzentrationsstufe 2000 mg/kgKG hin.

Da Norfloxacin und Ofloxacin im Vergleich zu Lomefloxacin und Ciprofloxacin bis dato noch wenig klinische Anwendung finden, bleibt offen, ob die Beobachtung im IMDS-Modell langfristig bestätigt wird. Da sich das photoallergische Potential nur in einem sehr schmalen Konzentrationsrahmen gezeigt hat, legen die Ergebnisse nur ein schwaches photoallergisches Potential nahe.

oral	Ohrdickenzunahme [mm x 10 ⁻²]	LK-Zellzahlindex	IMDS-DI
2000 mg/kgKG NORF	0,1 ±0,53	1,30	11,4
2000 mg/kgKG OFLO	0,1 ±0,70	1,68	25,7

Tab. 8: Ofloxacin und Norfloxacin als schwache Photoirritantien mit einem photoallergischen Potential

Die applizierten Substanzkonzentrationen betragen für Norfloxacin und Ofloxacin 2000 mg/kgKG. Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 6.

Titrationansätze mit niedrigen Konzentrationen Bay 3118, Sparfloxacin oder Lomefloxacin, wiesen ein solches Phänomen nicht auf.

Neben NMRI-outbreed-Mäusen wurden zwei weitere Inzuchtstämme B6C3F1 und BALB/c zur Untersuchung des Einflusses des genetischen Backgrounds auf das IMDS-Modell verwendet. Beide Inzucht-Stämme zeigten veränderte Sensitivitäten im Priming, den Parametern Ohrdickenzunahme und Lymphknotenproliferationsindizes und dem damit verbundenen IMDS-Quotienten.

Es konnten allerdings vergleichbare IMDS-Werte berechnet werden, wenn stammspezifische Maximalreaktionen für die Berechnung zugrunde gelegt wurden.

Beispielsweise reagieren BALB/c Stämme mit einer insgesamt schwächer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion der Haut als NMRI-Mäuse, d.h. die max. Ohrdickenzunahme und die max. Lymphknotenproliferation müssen anhand des jeweiligen Mausstammes definiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Das IMDS-Modell zur Prüfung topisch applizierter photoreaktiver Substanzen

3.3.1 Der photoirritative Standard 8-MOP nach topischer Applikation im IMDS-Modell

Homey et al. konnten zeigen, daß bei topischer Applikation einer 0,3%-igen 8-MOP-Lösung mit anschließender UV-A Bestrahlung eine signifikante Zunahme der Ohrdicke um 163% zu beobachten war. Die prozentuale Zunahme des Lymphknotenzellzahlindex vom Maximum betrug 31%. Der sich daraus errechnete IMDS-DI beträgt 0,2.

3.3.2 Der photoallergische Standard Olaquinox nach topischer Applikation im IMDS-Modell

In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob Olaquinox nicht nur nach oraler sondern auch nach topischer Applikation photoallergisch reagiert.

Die topische Applikation von Olaquinox (0,5 und 1%-ige- Lösung) mit nachfolgender UV-A Bestrahlung führte weder zu einer Zunahme der Ohrdicke noch zu einer Zunahme der Lymphknotenzellzahl. Olaquinox führt somit nicht zu einer Photoreaktion nach topischer Applikation (Tab. 9).

epikutan	Ohrdickenzunahme [mm x 10 ⁻²]	LK-Zellzahlindex	IMDS-DI
0,5% OLAQ	0,2 ±0,43	0,95	Kein IMDS-DI
1,0% OLAQ	0,2 ±0,29	1,12	Kein IMDS-DI

Tab. 9: Der photoallergische Standard Olaquinox IMDS-Modell nach topischer Applikation
An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden 5 NMRI-Mäusen pro Versuchsgruppe 25µl einer 0,5%-igen, 1%-igen Lösung Olaquinox, bzw. des Vehikels (DAE433) einmal pro Tag an den dorsalen Flächen beider Ohren aufgetragen. Anschließend wurden die Mäuse 10 J/cm² UV-A bestrahlt. Die Aufarbeitung und Auswertung des Versuchs gleicht dem der Tab.6.

3.4 Validierung des IMDS-Modells anhand von Chlorpromazin

Chlorpromazin illustriert die Komplexität des Gebietes der Photoreaktionen als klassisches Beispiel.

Es wirkt bei systemischer Verabreichung in hohen Dosen ausschließlich phototoxisch, in niedrigen Konzentrationen jedoch photoallergisch. Bei kutaner Applikation ist es nahezu obligat photoallergisch. (*Ippen, 1993*). Die folgenden Untersuchungen dienten dem Ziel zu prüfen, ob diese Phänomene mit Hilfe des IMDS-Modells zu analysieren sind.

Wie Tabelle 10 zeigt, erzeugte Chlorpromazin + UV-A im niedrigen Dosisbereich von 10 mg/kgKG eine deutliche Proliferation der Lymphknotenzellzahl mit einem Faktor von 1,64. Das Verhalten der Ohrdicke zeichnete sich durch eine relativ schwache Zunahme um 0,7 mm² aus. Der daraus resultierende IMDS-DI lag im Bereich der Photoallergie mit einem Index von 3,47.

Die weitere Titration ergab eine konzentrationsabhängige Zunahme der Ohrdicke für die Konzentrationen 50, 100 und 200 mg/kgKG. Die Zellzahlindizes der lokal drainierenden Lymphknoten hingegen blieben in einem Bereich zwischen 1,43 und 1,51, wobei der Index in der höchsten Konzentration (200 mg/kgKG) sogar abnahm und bei 1,11 lag.

Die errechneten IMDS-DI zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme der Indexzahl von 0,95 auf 0,03. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß

Chlorpromazin im IMDS-Modell die klinischen Beobachtungen bestätigt und im hohen Dosisbereich ein photoirritatives, im niedrigen Dosisbereich ein photoallergisches Potential aufweist.

oral	Ohrdickenzunahme [mm x 10 ⁻²]	LK-Zellzahlindex	IMDS-DI
10 mg/kgKG CHLO	0,7 ±0,52	1,64	3,47
50 mg/kgKG CHLO	1,7 ±0,50	1,43	0,95
100 mg/kgKG CHLO	6,8 ±2,43	1,51	0,28
200 mg/kgKG CHLO	15,4* ±4,78	1,11	0,03

Tab. 10: Dosis-Wirkungsbeziehung des Neuroleptikums Chlorpromazin nach oraler Applikation

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde fünf NMRI Mäusen pro Gruppe 10, 50, 100, 200 mg/kgKG Chlorpromazin oder das Vehikel Aqua bidest (Gruppe 1) oral appliziert. Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 6.

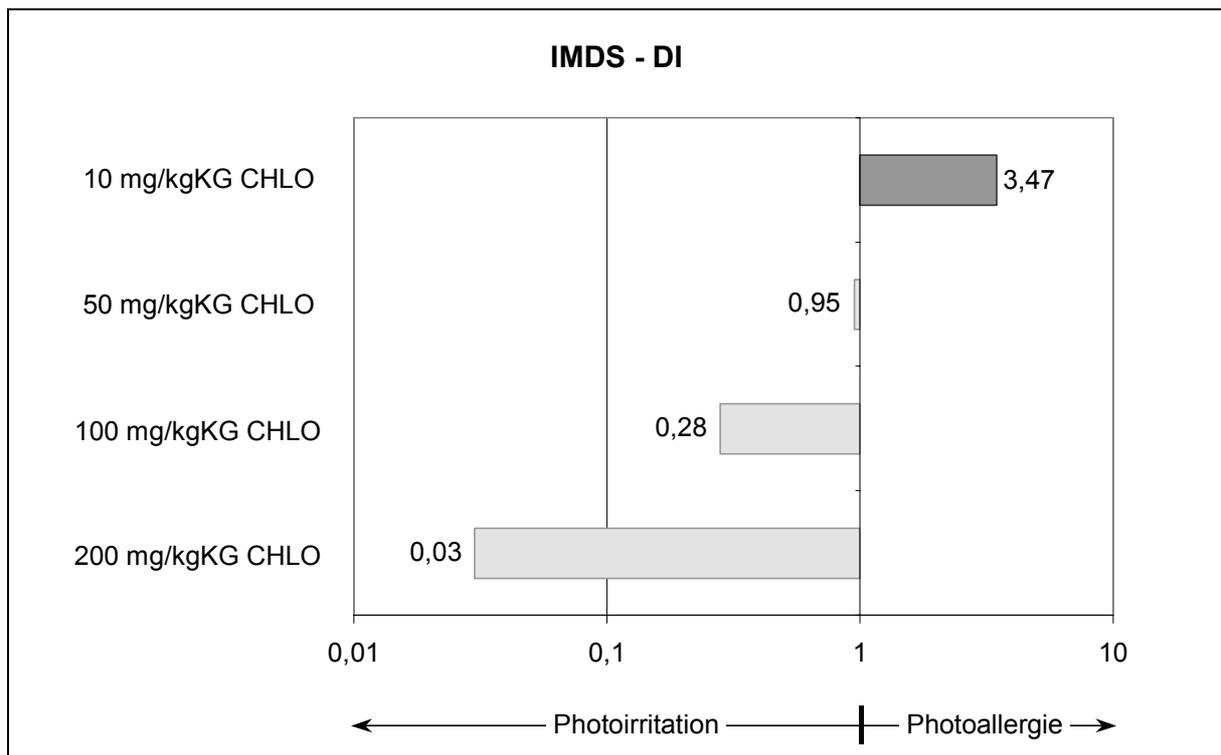


Abb. 10: Dosis-Wirkungsbeziehung des Neuroleptikums Chlorpromazin nach oraler Applikation anhand des logarithmisch dargestellten IMDS-DI
Die Daten wurden der Tab. 10 entnommen.

Die folgenden Versuche sollten klären, ob die von *Ippen (1993)* beschriebenen rein photoallergischen Reaktionen nach epikutaner Applikation mit Hilfe des IMDS-Modells nachzuvollziehen sind.

Nach topischer Applikation von 3, 5, 10 und 20%-iger Chlorpromazin-Lösung mit anschließender UV-A-Bestrahlung wurden eine deutliche Proliferation der lokal drainierenden Lymphknoten beobachtet. In allen Konzentrationsstufen lag der LLN-Index zwischen 2,01 und 2,28. Demgegenüber stand eine wohl konzentrationsabhängige, jedoch mit Werten zwischen 0,3 und 3,4 mm² eher dezente Ohrdickenzunahme.

Die IMDS-DI lagen in den untersuchten, topisch applizierten Konzentrationen eindeutig im Bereich der Photoallergie (IMDS-DI zwischen 13,5 und 1,4).

Die dargelegten Untersuchungen von Chlorpromazin nach dermalen und oraler Applikation unterstreichen damit die klinischen Beobachtungen.

epikutan	Ohrdickenzunahme [mm x 10 ²]	LK-Zellzahlindex	IMDS-DI
3%-ig CHLO	0,3 ±0,63	2,11	13,5
5%-ig CHLO	1,5 ±1,05	2,01	2,5
10%-ig CHLO	1,6 ±0,74	2,28	2,9
20%-ig CHLO	3,4 ±1,35	2,24	1,4

Tab. 11: Dosis-Wirkungsbeziehung des Neuroleptikums Chlorpromazin nach topischer Applikation

5 NMRI Mäuse pro Gruppe wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit drei und 10% Chlorpromazin oder Vehikel (DAE) auf den dorsalen Oberflächen beider Ohren behandelt. Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 9.

3.5 Zelluläre Ereignisse in der Epidermis während photoallergischer und photoirritativer Reaktionen der Haut

Um die, dem IMDS-Modell zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen einer photoallergischen oder photoirritativen Reaktion zu analysieren, wurden die zytokinvermittelten zellulären Ereignisse in der Epidermis und den lokal drainierenden Lymphknoten untersucht.

Versuche von *Ulrich et al.* zeigten, daß eine dreimalige Bestrahlung mit 10, bzw. 20 Joule/cm² keine immunmodulierende Wirkung auf die Expression der untersuchten Zelloberflächenmarker hat (*Ulrich et al, 1997*).

Mit Hilfe von flowzytometrischen Untersuchung wurden die jeweiligen Zellpopulationen nach Auslösung einer photoallergischen, bzw. photoirritativen dargestellt.

Die eine Zweitantwort charakterisierende Ausprägung von Gedächtnis-T-Zellen infolge der wiederholten Applikation photoallergischer Substanzen konnte durch die durchflußzytometrische Analyse von CD4⁺/CD45RB⁺ Lymphknotenzellpopulationen ausgeschlossen werden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse können somit eindeutig der Induktionsphase der lokalen Erstantwort zugeordnet werden und stellen damit keine Reaktionen im Sinne einer Zweitantwort dar (*van Loveren et al., 1984*).

3.5.1 Expression costimulierender Moleküle auf I-A⁺ Epidermiszellen

Die Induktion einer allergischen Primärantwort ist von der Reifung antigenpräsentierender Zellen abhängig. Dieser Maturationsprozeß wird durch die Sekretion primärer proinflammatorischer Zytokine der Epidermis (GM-CSF [granulocyte macrophage colony stimulating factor], IL-1 alpha, IL-1 beta und TNF alpha) in Gang gesetzt.

Ein daraus resultierender markanter Schritt dieses Reifungsprozesses ist die Expression costimulatorischer Moleküle (CD54, CD 80 und CD86) auf der Oberfläche antigenpräsentierender I-A⁺ Zellen. Costimulierende Moleküle (CD54, CD80 und CD 86) sind Voraussetzung für eine optimale T-Zellaktivierung (Steinmann et al., 1995).

Hypothetisch wird angenommen, daß sich photoallergische und photoirritative Reaktionen in der Transduktion des antigenspezifischen Signals 1 an T-Zellen im lokal drainierenden Lymphknoten unterscheiden. Um diese These zu hinterfragen, analysierten wir die Expression costimulierender Moleküle auf I-A⁺ Epidermiszellen. Die Untersuchung der Oberflächenmarker CD54, 80 und 86 auf I-A⁺ Zellen der Epidermis erbrachte folgende Ergebnisse:

Olaquinox rief im Rahmen der Primärantwort einer photoallergischen Reaktion eine Induktion von CD54 (Faktor 5,0), CD80 (3,32) und CD86 (5,67) hervor. Das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-I (Oberflächenmarker: CD54) wurde interessanterweise sowohl in der Induktionsphase primärer photoallergischer Reaktionen als auch photoirritativer Reaktionen in der Epidermis vermehrt exprimiert.

Neben CD54 wurden auch CD 80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf I-A⁺ Epidermiszellen sowohl nach photoallergische als auch photoirritativen Reaktionen zunehmend häufig angetroffen. Nach der oralen Applikation von 400 mg/kgKG Sparfloxacin + UV-A wurde der Oberflächenmarker CD54 um das 5,67-fache exprimiert, der Marker CD80 um das >23-fach und CD86 um das 14,4-fache.

Sparfloxacin induzierte entsprechend der starken Zunahme der Ohrdicke in diesem Dosisbereich die deutlichsten Effekte bezüglich der Expression der costimulatorischer Moleküle auf I-A⁺ Epidermiszellen.

Epidermis	I-A ⁺ / CD54 ⁺	I-A ⁺ / CD80 ⁺	I-A ⁺ / CD86 ⁺
10 mg/kgKG 8-MOP	5,73	1,08	1,18
400 mg/kgKG SPAR	5,67	23,11	14,40
400 mg/kgKG LOME	4,31	7,20	7,60
3000 mg/kgKG ENOX	2,71	3,34	2,96
400 mg/kgKG ENOX	4,00	2,89	2,09
50 mg/kgKG OLAQ	5,00	3,32	5,67

Tab. 12: Expression costimulatorischer Moleküle auf MHC Klasse II⁺ epidermalen Zellen während der Induktionsphase photoallergischer und photoirritativer Reaktionen

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden fünf NMRI Mäuse pro Gruppe 10 mg/kgKG 8-MOP, 400 mg/kgKG Sparfloxacin, 400 mg/kgKG LOME, 400, bzw. 3000 mg/kgKG ENOX oder 50 mg/kgKG Olaquinox oder das Vehikel Aqua bidest oral appliziert. Nach einer systemischen Verteilungszeit von 30 min wurden die Mäuse mit 20 J/cm² UV-A bestrahlt. 24 h nach der letzten Behandlungseinheit wurden die Ohren präpariert. 10⁶ Epidermiszellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen MHC Klasse II Moleküle (I-A), CD54, CD80 und CD86 gefärbt, in einem FACSCalibur Durchflußzytometer analysiert und mit CellQuest Analysis und Akquisition Software, Version 1.2 (Becton Dickinson, Heidelberg), ausgewertet. Um Daten aus verschiedenen Versuchen vergleichbar zu machen, wurde ein Index gebildet. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von einem aus drei Experimenten.

Die Korrelation der konzentrationsabhängigen Ohrdickenzunahme mit einer vermehrten Expression costimulatorischer Moleküle wurde in Versuchen mit BAY-Y-3118 deutlich. Die Konzentrationsstufen 5, 25 und 50 mg/kgKG führten zu Ohrdickenzunahmen von 1,2, 15,4 und 26,6 mm⁻² (siehe Tab. 5).

Die im Rahmen des gleichen Versuchsaufbaus durchgeführten durchflußzytometrischen Analysen der Epidermiszellen erbrachten eine Induktion der Oberflächenmarker CD54, CD80 und CD86 in direkter Abhängigkeit von der Ohrdicke und damit der applizierten Substanzkonzentration. CD86 (B7-2) beispielsweise wurde 1,4-fach nach der Applikation von 5 mg/kgKG BAY-Y-3118 exprimiert, 5,53-fach nach der Applikation von 25 mg/kgKG BAY-Y-3118 und 8,0-fach nach 50 mg/kgKG BAY-Y-3118.

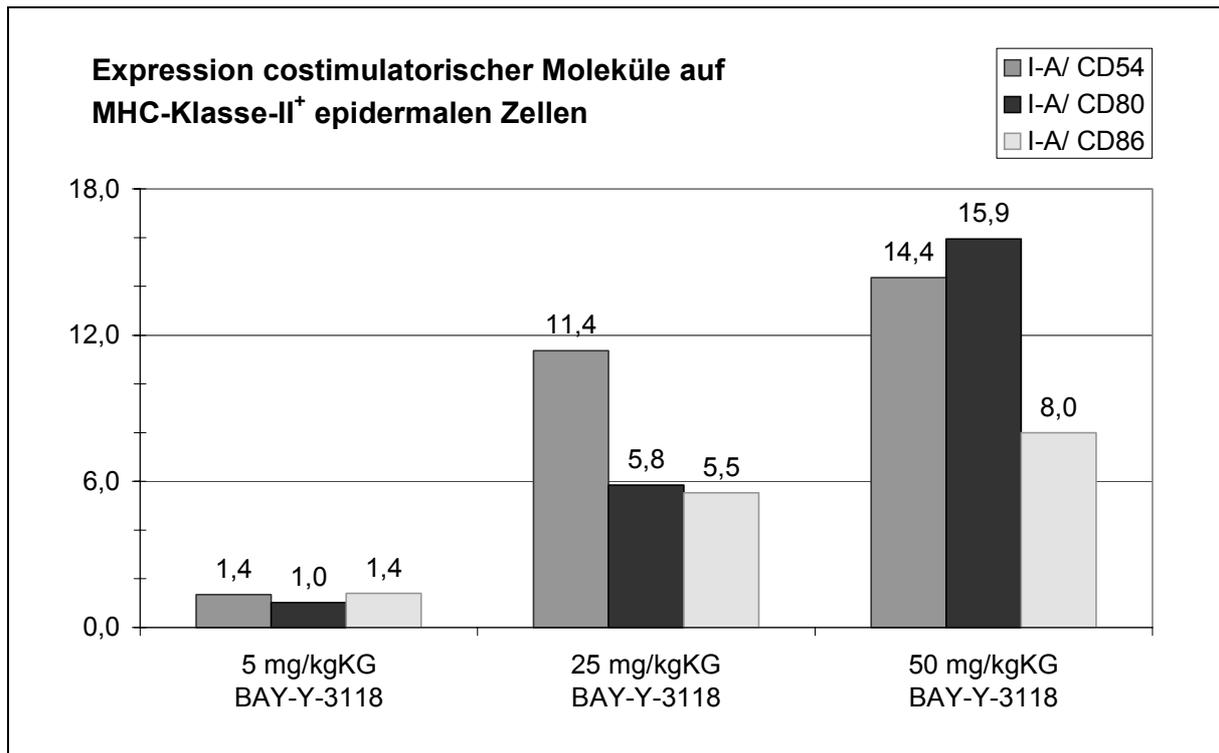


Abb. 11: Expression costimulatorischer Moleküle auf MHC Klasse II⁺ epidermalen Zellen während der Induktionsphase einer photoirritativen Reaktion in Abhängigkeit der lokalen Entzündungsreaktion, bzw. der applizierten Substanzmenge

An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden fünf NMRI Mäuse pro Gruppe 5, 25, 50 mg/kgKG BAY-Y-3118 oder das Vehikel Aqua bidest (Gruppe 1) oral appliziert. Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 12.

3.5.2 Einwanderung von CD11b⁺ und CD11c⁺ Zellen in die Haut im Rahmen photoallergischer und photoirritativer Reaktionen der Haut

CD11b (Mac-1 alpha-Kette) repräsentiert die alpha_M-Kette des alpha_Mbeta₂ Integrins, LFA-1, das funktionell bei der Adhäsion mit ICAM-I eine Rolle spielt und auf der Oberfläche von Granulozyten und Makrophagen exprimiert wird (*Springer et al., 1979, Beller et al., 1982*). Flowzytometrisch lassen sich Makrophagen (CD11b⁺/I-A⁺) und Granulozyten (CD11b⁺/I-A⁻) unterscheiden.

Die Analyse der Epidermiszellen ergab eine Zunahme der Makrophagenpopulation (CD11b⁺/I-A⁺) im Rahmen einer photoirritativen (Bsp.: 8-MOP, 2,35-fache Expression von CD11b auf I-A⁺ Zellen) und primären photoallergischen Reaktionen (Bsp.: Olaquinox: 3,17-fache Expression von CD11b auf I-A⁺ Zellen).

Im Rahmen photoirritativer Reaktionen, insbesondere nach der oralen Applikation von 8-MOP (10 mg/kgKG) zeichnete sich eine massive Infiltration von Granulozyten in der Epidermis ab. Im Gegensatz hierzu war nach der Verabreichung des photoallergischen Standards Olaquinox keine Zunahme der Granulozytenpopulation zu erkennen (CD11b⁺/I-A⁻: 1,00).

Eine weitere Gruppe stellen die dendritischen Zellen (Steinmannzellen) der Haut dar, die sogenannte Gewebsmakrophagen (*Fritsch et al., 1998*). Es sind MHC Klasse II tragende Leukozyten aus dem Knochenmark, die gleichmäßig die Haut besiedeln und die der reifen Form der Langerhans Zelle entsprechen.

Der Oberflächenmarker CD11c wird als Indikatormolekül im Maussystem, analog zu CD1a im humanen System verwendet (*Metlay et al., 1990; Saunders et al., 1996; Inaba et al., 1997*).

Die dargestellten Ergebnisse für CD11c⁺/I-A⁺ Zellen lassen erkennen, daß Enoxacin eine massive Zunahme (11,7-fach) dendritischer Zellen in die Epidermis bewirkt. Auch weitere photoirritative Substanzen wie Sparfloxacin und Lomefloxacin bewirken diesen Effekt, wenn auch schwächer.

Der photoallergische Standard Olaquinox ruft eine Induktion der CD11c⁺/I-A⁺ Zellen um das 1,63-fach hervor.

Epidermis	CD11b ⁺ /I-A ⁺	CD11b ⁺ /I-A ⁻	CD11c ⁺ /I-A ⁺
10 mg/kgKG 8-MOP	2,35	88,0	0,38
400 mg/kgKG SPAR	1,81	19,83	1,70
400 mg/kgKG LOME	1,44	22,68	2,46
400 mg/kgKG ENOX	1,61	2,60	3,85
3.000 mg/kgKG ENOX	2,17	11,65	11,77
50 mg/kgKG OLAQ	3,17	1,00	1,63

Tab. 13: Aktivierung von Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen in der Epidermis während primärer photoallergischer und photoirritativer Reaktionen der Haut

Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 12. 10⁶ Epidermiszellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen MHC Klasse II Moleküle (I-A), CD11b und CD11c gefärbt, in einem FACSCalibur Durchflußzytometer analysiert und mit CellQuest Analysis und Akquisition Software, Version 1.2 (Becton Dickinson, Heidelberg), ausgewertet. Um Daten aus verschiedenen Versuchen vergleichbar zu machen, wurde ein Index gebildet. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von einem aus drei Experimenten.

3.5.3 Epidermale T-Zell-Rekrutierung und die Expression des „Very Early Activation Antigen“ (CD69) auf I-A⁺ Zellen der Epidermis

Um eine gerichtete T-Zellmigration in der Haut nachweisen zu können, wurden CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in der Epidermis untersucht. CD4 wurde insbesondere nach Applikation der photoirritativen Substanzen Sparfloxacin (18,36-fach) und Lomefloxacin (12,4-fach) beobachtet.

Während der Induktionsphase photoallergischer Reaktionen wurde eine eher schwache Vermehrung CD4⁺ Zellen nachgewiesen. Interessant wären aus immunologischer Sicht Analysen der T-Zellinfiltration im Rahmen der Zweitantwort, für die eine massive Infiltration von T-Zellen in die Epidermis charakteristisch ist.

Das „Very Early Activation Antigen“ (CD69) ist ein Aktivierungsmarker, der *in vitro* innerhalb von Minuten bis Stunden nach Stimulation auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird (Yokoyama *et al.*, 1988). Außer auf T-Zellen konnte CD69 auch auf der Oberfläche von B-Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden.

Somit handelt es sich bei der I-A⁺/CD69⁺ Lymphknotenzellpopulation um eine Mischpopulation aus aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl bei photoallergischen als auch photoirritativen Reaktionen vermehrt CD69 auf I-A⁺ Zellen exprimiert wird.

Epidermis	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD69 ⁺ /I-A ⁺
10 mg/kgKG 8-MOP	nicht gemessen	3,10	1,40
400 mg/kgKG SPAR	18,36	11,12	7,20
400 mg/kgKG LOME	12,4	9,40	7,60
400 mg/kgKG ENOX	2,64	2,26	2,4
50 mg/kgKG OLAQ	1,44	1,2	2,60

Tab. 14: T-Zellrekrutierung und Einwanderung in die Epidermis und Expression des „Very Early Activation Antigen“ (CD69)

Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 12. 10^6 Epidermiszellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4, CD8, MHC Klasse II Moleküle (I-A) und CD69 gefärbt. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von einem von mehr als drei Experimenten.

3.6 Zelluläre Ereignisse in lokal drainierenden Lymphknoten der Haut

3.6.1 Expression costimulierender Moleküle auf I-A⁺ Zellen in lokal drainierenden Lymphknoten der Haut

Nach oraler Behandlung mit 8-MOP, Sparfloxacin und Lomefloxacin stieg die Expression von CD54 nur marginal (Sparfloxacin: 1,33-fach) an oder sank sogar im Falle von 8-MOP und Lomefloxacin ab (Index: 0,73 und 0,91).

Enoxacin rief im Dosisbereich von 400 mg/kgKG eine photoallergische Reaktion (IMDS-DI: 2,9, siehe Tab. 7) hervor und ist damit in diesem Bereich für eine photoallergische Reaktion repräsentativ. Enoxacin induziert einen massiven Anstieg von CD54⁺/I-A⁺ Zellen mit einer Induktionsrate von 17,00. Olaquinox folgt Enoxacin mit einer Verdreifachung (Faktor 3,02 auf CD54⁺/I-A⁺ Zellen).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Epidermis im Rahmen photoirritativer Reaktionen werden im lokal drainierenden Lymphknoten nur sehr schwache Induktionsraten bis hin zu fehlenden Induktionsraten der Expression costimulatorischer Moleküle auf I-A⁺ Zellen angetroffen. Die orale Applikation von 10 mg/kgKG 8-MOP+ UV-A führte zu einer Vermehrung von CD80 auf I-A⁺ Zellen um das 2,01-fache. Sie ist damit die stärkste Induktionsrate für diesen Marker, die bei photoirritativen Substanzen gemessen wurde. CD86 (B7.2) wurde im lokal drainierenden Lymphknoten bei photoirritativen Reaktionen um max. 10% (400 mg/kgKG Sparfloxacin: Faktor 1,10 auf I-A⁺/CD86⁺ Zellen) vermehrt angetroffen.

Revers zu den photoirritativen Substanzen induziert Olaquinox insgesamt eine massive Induktion der costimulatorischer Moleküle CD54, CD80 und CD86 (Induktionsraten zwischen 3,02 und 7,14) auf I-A⁺ Zellen im lokal drainierenden Lymphknoten als Zeichen einer spezifischen Immunantwort im Rahmen primärer photoallergischer Reaktionen.

Lymphknoten	I-A ⁺ / CD54 ⁺	I-A ⁺ / CD80 ⁺	I-A ⁺ / CD86 ⁺
10 mg/kgKG 8-MOP	0,73	2,01	1,04
400 mg/kgKG SPAR	1,33	1,19	1,10
400 mg/kgKG LOME	0,91	1,02	0,93
400 mg/kgKG ENOX	17,00	1,24	1,0
50 mg/kgKG OLAQ	3,02	7,11	7,14

Tab. 15: Expression costimulatorischer Moleküle auf MHC Klasse II⁺ Lymphknotenzellen während der Induktionsphase einer photoallergischen und photoirritativen Reaktion

Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 12. 10⁶ Lymphknotenzellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen MHC Klasse II Moleküle (I-A), CD54, CD80 und CD86 gefärbt, in einem FACSCalibur Durchflußzytometer analysiert und mit CellQuest Analysis und Akquisition Software, Version 1.2 (Becton Dickinson, Heidelberg), ausgewertet. Um Daten aus verschiedenen Versuchen vergleichbar zu machen wurde, ein Index gebildet. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von einem von mehr als drei Experimenten.

Um auszuschließen, daß nach dreimaliger Applikation von Kontaktallergenen bereits Reaktionen im Sinne einer Sekundärantwort (Challenge-Reaktion) auftreten, wurden flowzytometrische Untersuchungen der Oberflächenmarker CD4/CD45RC auf den Zellen der lokal drainierenden Lymphknoten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß keine Zunahme der CD4/CD45RC doppelt positiven Zellen zu verzeichnen ist (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 B-Zellaktivierung und Expression des „Very Early Activation Antigen“ (CD69) auf I-A⁺ Lymphknotenzellen

Mit Hilfe des Pan-B-Zell-Markers B220 (CR45R) wurde die B-Zellaktivierung bei photoallergischen und photoirritativen Reaktionen in lokal drainierenden Lymphknoten analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß Photoallergene eine massive Expansion von B220⁺/I-A⁺ Lymphknotenzellen induziert (Olaquinox: Faktor 4,79), wobei die Expansion aktivierter B-Zellen während photoirritativer Reaktionen (8-MOP: Faktor 1,23) deutlich schwächer ausfiel (Abb.7).

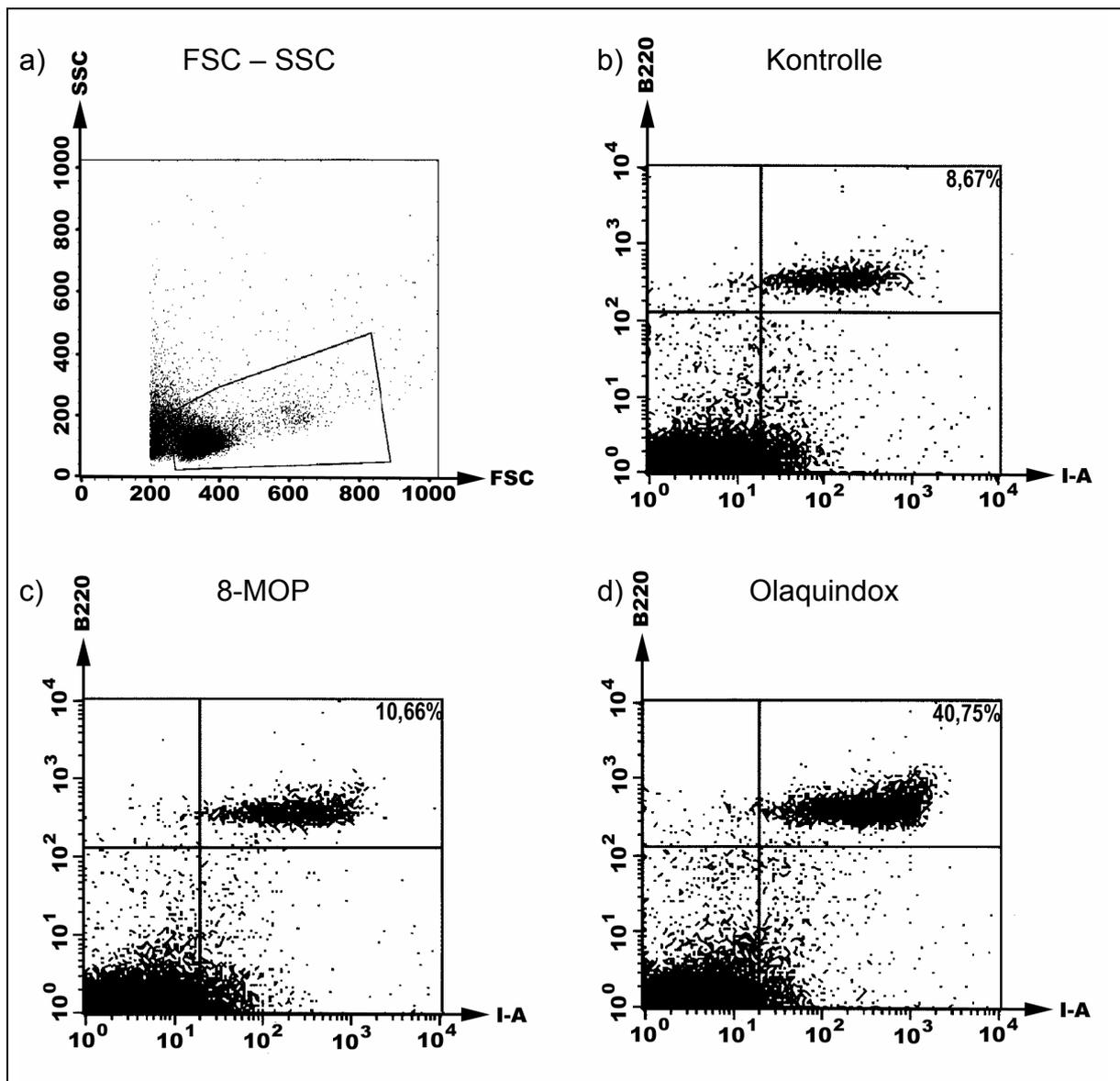


Abb. 12: Assoziierte B-Zellaktivierung in lokal drainierenden Lymphknoten der Haut während primärer photoallergischer und photoirritativer Reaktionen.

10^6 Lymphknotenzellen von Vehikel-, 8-Mop- und Olaquinox behandelten Versuchstieren wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen MHC Klasse II Moleküle (I-A) und CD45R/B220 inkubiert und die Expansion B220⁺/I-A⁺ Lymphknotenzellen flowzytometrisch analysiert. Die Quadrantenstatistik wurde orientierend an den Isotypenkontrollen durchgeführt. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von einem von mehr als drei Experimenten.

In der zytokinvermittelten Aktivierung von B-Zellen spielen IL-4 und IL-6 eine entscheidende Rolle. *In vitro* führt IL-2 zu einer ausgeprägten Expansion der MHC Klasse II Moleküle auf B-Zellen (Paul und O`Hara, 1987).

Der Aktivierungsmarker CD69 auf MHC Klasse II positiven Zellen wurde im Rahmen der photoallergischen Reaktion auf Oloquinox um das > 5-fache exprimiert. Im Gegensatz hierzu zeigen Photoirritantien wie Sparfloxacin oder Lomefloxacin keine Induktion von CD69 auf I-A⁺ Zellen.

Die Oberflächenmarker B220 und CD69 auf I-A⁺ Zellen können damit Hinweise auf photoallergische Reaktionen geben und bei der Abgrenzung zu Photoirritantien helfen.

Lymphknoten	B220 ⁺ /I-A ⁺	CD69 ⁺ /I-A ⁺
10 mg/kgKG 8-MOP	1,23	0,77
400 mg/kgKG SPAR	1,45	0,98
400 mg/kgKG LOME	1,25	1,05
400 mg/kgKG ENOX	1,77	1,21
50 mg/kgKG OLAQ	4,79	5,79

Tab. 16: B-Zellaktivierung und die Expression des ‚Very Early Activation Antigen‘ (CD69) auf I-A⁺Zellen im lokal drainierenden Lymphknoten der Haut bei photoallergischen und photoirritativen Reaktionen der Haut

Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 12. 10⁶ Lymphknotenzellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen MHC Klasse II Moleküle (I-A), B220 und CD69 gefärbt, in einem FACSCalibur Durchflußzytometer analysiert und mit CellQuest Analysis und Akquisition Software, Version 1.2 (Becton Dickinson, Heidelberg), ausgewertet. Um Daten aus verschiedenen Versuchen vergleichbar zu machen wurde ein Index gebildet. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse aus drei Experimenten.

3.6.3 Einwanderung CD11b⁺ und CD11c⁺ Zellen in den lokal drainierenden Lymphknoten

Die Beobachtung CD11b⁺ Zellen während primärer kontaktallergischer Reaktionen sollte Hinweise auf die noch sehr unklare Rolle CD11b⁺/I-A⁺ antigenpräsentierender Zellen während primärer photoallergischer Reaktionen geben. Der photoallergische Standard Olaquinox rief in dem unten aufgeführten Versuch eine starke Proliferation dieser Zellpopulation (Faktor: 3,39) hervor, wohingegen kein Photoirritans auch bei sehr starker Inflammation wie bei 8-MOP (Faktor: 1,84) eine solche Reaktion bewirken konnte.

Der Oberflächenmarker CD11c wird in jüngeren Studien als Indikatormolekül für dendritische Zellen im Maussystem beschrieben. Auch die Oberflächenmarker DEC 205, CD80 und CD86 werden im Maussystem verwendet (*Saunders et al., 1996* und *Maraskovsky et al., 1996*). Im humanen System ist CD1a seit längerer Zeit als zuverlässiger Marker für dendritische Zellen im lokalen Immunsystem der Haut bekannt. Interessanterweise konnte sowohl während photoallergischer am Beispiel von Olaquinox als auch photoirritativer Reaktionen am Beispiel von 8-MOP eine Expansion CD11c⁺/I-A⁺ Zellen festgestellt werden.

Lymphknoten	CD11b ⁺ /I-A ⁺	CD11c ⁺ /I-A ⁺
10 mg/kgKG 8-MOP	1,84	3,23
400 mg/kgKG SPAR	0,63	1,13
400 mg/kgKG LOME	1,14	1,02
400 mg/kgKG ENOX	1,15	0,62
50 mg/kgKG OLAQ	3,39	1,87

Tab. 17: Einwanderung CD11b⁺ und CD11c⁺ Zellen in den lokal drainierenden Lymphknoten der Haut während primärer photoallergischer und photoirritativer Reaktionen

Das Behandlungs- und Bearbeitungsprotokoll entspricht dem der Tab. 12. 10⁶ Lymphknotenzellen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen MHC Klasse II Moleküle (I-A), CD11b und CD11c gefärbt. Um Daten aus verschiedenen Versuchen vergleichbar zu machen, wurde ein Index gebildet. Die Daten zeigen repräsentative Ergebnisse von einem aus drei Experimenten.

3.6.4 T-Zellaktivierung im lokal drainierenden Lymphknoten

Um die T-Zellaktivierung im lokal drainierenden Lymphknoten zu analysieren, wurde die Expression der IL-2-Rezeptor alpha-Kette (CD25) sowie die des „Very Early Activation Antigen“ (CD69) auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphknotenzellen beobachtet.

Olaquinox führt zu einer Zunahme der CD4⁺/CD25⁺ Zellen um 35%. Die photoirritativen Substanzen hingegen zeigen maximale Zunahmen von bis zu 16% (Lomefloxacin).

Olaquinox führte ebenso zu starken Zunahmen von CD25 und CD69 auf CD8⁺ Zellen und repräsentiert insbesondere bei CD8/CD69 die stärkste Induktion im Vergleich mit den Photoirritantien 8-MOP und Sparfloxacin (Daten nicht gezeigt). Insgesamt jedoch können die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf CD4⁺ und CD8⁺ Zellen nicht zwischen photoallergischen und photoirritativen Reaktionen differenzieren.

T-Zellen reagieren nicht nur auf spezifische Aktivierung sehr sensibel, sondern auch auf die unspezifische Zytokinausschüttung während inflammatorischer Reaktionen. T-Zellen werden bei spezifischer Aktivierung effektiver aktiviert und sind damit sensibler für diesen Aktivierungsweg.

4. Diskussion

Photoallergische und photoirritative Reaktionen der Haut zeigen klinisch und histologisch zahlreiche Gemeinsamkeiten, die viele Differenzierungsmöglichkeiten anhand morphologischer Parameter wie dem Erythem, der Spongiose, Bläschenbildung oder Schuppung ausschließen (*Brasch et al., 1992; Berardesca et Distanto, 1995*).

Vorhandene Studien zur Differenzierung photoreaktiver Substanzen vergleichen zumeist Reaktionen in der Auslösephase der Photokontaktallergie (Challenge-Reaktion) mit irritativen Reaktionen der Haut. Unter diesen Bedingungen ist die Morphologie der entstehenden Hautveränderung sowie das histologische Bild mit hautinfiltrierenden T-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen während beider Reaktionen sehr ähnlich (*Gawkrodger, 1984; Lens, 1983*).

Vor dem Hintergrund dieser bestehenden Differenzierungsproblematik gründet das vorgelegte IMDS-Modell zur Erfassung und Analyse photoreaktiver Substanzen seine Aussage auf der immunologischen Genese der jeweiligen Immunantwort während des Primärkontaktes, also der Induktionsphase der Reaktion. Es ermöglicht die Detektion, vor allem jedoch erstmals auch die Differenzierung photoallergischer und photoirritativer Substanzen. Durch die Möglichkeit, Substanzen nach oraler Applikation zu testen, können nun human- und klinikrelevante Aussagen über die photoreaktiven Eigenschaften von Arzneimitteln, pflanzlichen Stoffen, Nahrungszusätzen, etc. getroffen werden.

Unter immunologischen Gesichtspunkten unterscheiden sich photoirritative und photoallergische Reaktionen während der Primärantwort durch die antigenspezifische Induktion des photoallergischen und den unspezifischen zytotoxischen Charakter des photoirritativen Reaktionstyps (*Avnstorp et al., 1989*). Legt man diese Beobachtung zugrunde, sollten sich die Reaktionen auf der Ebene der Antigenpräsentation, der T-Zellaktivierung, der costimulatorischen Moleküle und der Memory-T-Zellbildung unterscheiden.

Aufgrund dieser Überlegungen differenziert das IMDS-Modell mittels immunologischer Endpunkte photoallergischer und photoirritativer Reaktionen. Die Parameter dieser Endpunkte sind die Ohrdickenzunahme zur objektiven Messung der lokalen Entzündungsreaktion der Haut und die Lymphknotenzellzahl zur Objektivierung der Reaktion im lokal drainierenden Lymphknoten.

Anhand des auf der Grundlage dieser Parameter errechneten IMDS-Differenzierungsquotienten lassen sich erstmalig Photoreaktionen in photoallergische und photoirritative unterscheiden. Ein IMDS-DI < 1 steht für photoallergische und ein IMDS-DI > 1 für photoirritative Reaktionen.

Da die Haut und ihre lokal drainierenden Lymphknoten funktionell voneinander abhängig sind, werden in der vorliegenden Arbeit beide Komponenten als immunologische „Einheit“ betrachtet und im Rahmen von Photoreaktionen erstmals gemeinsam immunologischen Analysen unterzogen.

4.1 Das IMDS-Modell zur Untersuchung photoreaktiver Substanzen

Um die Haut und die lokal drainierende Lymphknoten als immunologische Einheit in einem Untersuchungsmodell repräsentieren zu können, bezieht das IMDS-Modell im Gegensatz zum Local Lymph Node Assay (LLNA) die Entzündungsreaktion der Haut als Funktion der Ohrdickenzunahme im Test mit ein (*Basketter et Scholes, 1991*).

Im Überblick zeigen primäre photoallergische Hautreaktionen eine signifikante Lymphknotenzellaktivierung ohne die Entwicklung einer ausgeprägten Entzündung der Haut (Ohrdickenzunahme), während die Photoirritation erst nach der Entwicklung massiver inflammatorischer Hautreaktionen zu einer signifikanten Lymphknotenzellaktivierung führt. Diese Lymphknotenaktivierung resultiert aus dem sogenannten Bystander-Effekt. Er stellt unspezifische, indirekte immunologische Phänomene dar und zeigt eine polymorphe und polyklonale Reaktionsweise. „Bystander-Effekte“ können daher als Ergebnis zellulärer Interaktionen unter Abwesenheit einer spezifischen Antigen-Rezeptor Reaktion betrachtet werden.

In den letzten Jahren wurden neue *in vitro* Tests entwickelt, durch die eine Aussage über das photoirritative Potential einer Substanz getroffen werden kann (*Duffy et al., 1987, Wagai, 1992; Yu et al., 1996; Pape et al., 1997; Spielmann et al., 1995; Edwards et al., 1994*).

In vitro Tests wie exemplarisch der 3T3 NRU PT- Test können bisher nur eine auf primäre Photosensibilisatoren begrenzte Aussage treffen. Die zur Entstehung sekundärer Photosensibilisatoren essentiellen metabolisierenden Enzyme, Bindungsproteine oder Carrier-Komplexe können derzeit in einem *in vitro* System nicht bereitgestellt werden. Zudem fehlen Zellen und Zellverbände, wie beispielsweise Langerhanszellen, die bei der Entstehung photoallergischer Reaktionen elementar wichtig sind.

In vitro Systeme erfahren eine weitere Limitierung durch die mangelnde Löslichkeit von Substanzen, durch inadäquate Penetration (intakte Haut versus Zellsuspension) oder auch durch lichtunabhängige Zytotoxizität. Eine oft stark ausgeprägte Zytotoxizität wird durch die qualitativ und quantitativ abnorme Verfügbarkeit der Substanz in *in vitro* Tests hervorgerufen. Diese unmittelbar wirksame Toxizität ist mit *in vivo* Situationen nicht vergleichbar.

Die Komplexität eines Organismus ist damit momentan in einem *in vitro* Modell weder ganzheitlich zu erfassen noch nachzuahmen.

Das von *Edwards et al. 1994* vorgestellte *in vitro* Modell einer 3D Haut berücksichtigt bereits einige der oben angeführten Kritikpunkte. Die 3D Haut stellt beispielsweise dendritische Zellen zur Verfügung, die für die Induktion einer allergischen Reaktion von großer Bedeutung sind. Im Gegensatz zu einer Zellsuspension wird die Einzelzelle im Netzwerk der 3D Haut vor der direkten Zytotoxizität der Substanz geschützt (*Maurer, 1980*).

Die unmittelbare Wirkung des UV-Lichtes zur Untersuchung photoreaktiver Substanzen in *in vitro* Modellen kann zu einer direkten phototoxischen Schädigung der Zellsuspensionen führen. Die Abbildung der speziellen UV-Wirkungen *in vitro*, wie Immunsuppression und Aktivierung von Substanzen zur Ausbildung von Prohaptenen stellt zudem ein Problem dar, da inflammatorische Zytokine, Enzyme und die Wechselwirkung der verschiedenen Zellbestandteile einzelner Hautschichten wichtige, auch protektive Funktionen *in vivo* ausüben.

Wechselwirkungen der verschiedenen Zellbestandteile bei der Ausbildung photoirritativer und photoallergischer Reaktionen beschränken sich nicht nur auf bestimmte Zellpopulationen der Haut, sondern reichen vielmehr über Blutbestandteile und Leberenzyme bis zu der tragenden Rolle lokal drainierender Lymphknoten. Vor allem ihre Rolle wurde in der vorliegenden Arbeit eingehend analysiert.

Betrachtet man *in vivo* Testsysteme zur Abschätzung des phototoxikologischen Risikos, stehen vor allem modifizierte biphasische Testsysteme wie der Bühler Test, der Guinea Pig Maximization Test, der Optimization Test nach Maurer oder der Mouse Ear Swelling Test (MEST) zur Verfügung.

Die Ergebnisse dieser Testsysteme werden nicht wie im IMDS-Modell anhand der Primärantwort sondern der Zweitantwort einer photoallergischen Reaktion gewonnen (Bos, 1993).

Durch die notwendige Challenge-Reaktion benötigen sie einen langen Untersuchungszeitraum von 10 (Bsp. UV-MEST, Methode nach Gerberick und Ryan, 1990) bis zu 50 Tagen (Bsp. Optimization Test nach Maurer), viele Versuchstiere und einen hohen personellen Aufwand (Bühler et al., 1995, Magnusson et al., 1969, Maguire et al., 1972, Maurer et al., 1975 et 1980, Gad et al., 1986 et 1990).

Die o.g. Testmethoden zur prädiktiven immuntoxikologischen Analyse der photosensibilisierenden Potenz von neuen Chemikalien werden von der OECD für die Registrierung neuer Medikamente akzeptiert. So auch der LLNA (Local Lymph Node Assay) und UV-LLNA, die bereits eine Weiterentwicklung dieser Methoden darstellen.

Im Rahmen des UV-LLNA nach Kimber et Weisenberger (1992) wird radioaktiv markiertes $^3\text{[H]}$ -Thymidin zur Messung der Lymphknotenaktivierung verwendet.

Die Vorteile des monophasischen UV-LLNA sind die objektive Bewertung von Testreaktionen ($^3\text{[H]}$ -Thymidin), deutlich reduzierte Versuchstierzahlen und eine relativ kurze Versuchsdauer von 6 Tagen. Es können zudem problemlos farbige Substanzen getestet werden. Durch das radioaktive $^3\text{[H]}$ -Thymidin werden jedoch die sicherheitstechnischen, ökonomischen und know-how-Ansprüche erhöht.

Ferner sind die im LLNA und UV-LLNA gewonnenen Lymphknotenzellen aufgrund der radioaktiven Kontamination nicht für weitere molekulare und zelluläre Analysen verwendbar. Die Entsorgung der Versuchstiere und Verbrauchsmaterialien radioaktiv kontaminierter Stoffe birgt an sich eine Problematik.

Infolgedessen wurde in der vorliegenden Arbeit das ursprüngliche Testprotokoll des LLNA modifiziert und die Lymphknotenzellproliferation als Funktion der Zunahme des Lymphknotengewichtes und der Lymphknotenzellzahl analysiert, so daß auf eine radioaktive Markierung verzichtet werden konnte. Zusätzlich konnten nun auch molekulare und zelluläre Untersuchungen mit denen im jeweiligen Versuch gewonnen Lymphknoten durchgeführt werden. Die Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse zeigt, daß das Lymphknotengewicht und insbesondere die Lymphknotenzellzahl mit der Lymphknotenproliferation korrelieren und diese durch den Lymphknotenzellzahlindex gut charakterisiert werden kann.

Für Analyseparameter eines prädiktiven Testsystems *muß* generell gefordert werden, daß die Bewertungskriterien einfach und zuverlässig zu erheben sind.

Beim Guinea Pig Maximization Test nach Maurer dient die subjektive Erythemeinschätzung anhand eines 5-stufigen Erythemscores des Versuchsdurchführers zur Bewertung der Reaktion. Farbige Testsubstanzen können die Bewertung des Erythems daher weiter erschweren.

Die im IMDS-Modell ermittelte Ohrdickenzunahme ist ein objektiv meßbarer und reproduzierbarer Parameter des Endpunktes einer inflammatorischen Hautreaktion.

Ein spezielles Ausarbeitungsverfahren ermöglichte erstmals vergleichende molekulare Analysen von Epidermiszellen.

Zu beachten ist, daß im MEST (Mouse Ear Swelling Test) die Ohrdickenzunahme im Rahmen der Challenge-Reaktion den photo-/allergischen Charakter der Substanz bestätigt. Diese Reaktion stellt somit die Sekundärantwort einer Photo-/Kontaktallergie dar, bei der die Ohrdickenzunahme durch die Infiltration spezifischer T-Zellen zustande kommt. Im IMDS-Modell hingegen repräsentiert dieser Parameter den Grad der Entzündungsreaktion während einer Primärantwort und ist damit morphologischer Endpunkt photoirritativer Reaktionen.

Schilling et al. fanden bei Untersuchungen mit Crotonöl heraus, daß im Rahmen irritativer Reaktionen die prozentuale Proliferation der Lymphknotenzellzahl ab Tag sieben der prozentualen Zunahme der Ohrdicke überwiegt. Die Untersuchungen bestätigten die Notwendigkeit, den Versuchszeitraum zur Analyse einer Primärantwort auf ca. vier Tage zu beschränken. Damit wäre zu diesem Zeitpunkt rein rechnerisch ein Umschlagen des IMDS-Differenzierungsquotienten von einer irritativen Reaktion in eine allergische zu beobachten (*Diplomarbeit, C. von Schilling, 2000*).

Die Kinetik von 8-MOP zeigte, daß diese Beobachtung nicht uneingeschränkt auf photoirritative Substanzen übertragbar ist. An allen Versuchstagen zeigt 8-MOP einen Differenzierungsquotienten kleiner 1 und damit ein photoirritatives Potential. Zu beobachten ist jedoch eine kontinuierliche Zunahme der Lymphknotenzellzahl und eine Reduktion der Ohrdickenzunahme. Die Beschränkung des IMDS-Modells auf vier Versuchstage dient damit unter anderem der Eindeutigkeit der Unterscheidungskriterien anhand der immunologischen Endpunkte Ohrdickenzunahme und Lymphknotenproliferation.

Die Versuche mit Olaquinox zeigten, daß nach topischer Applikation weder photoallergische noch photoirritative Reaktionen zu beobachten waren. Nach oraler Applikation hingegen zeichnete sich Olaquinox als starkes Photoallergen aus. Hieraus ist abzuleiten, daß Olaquinox nach epikutaner Applikation entweder die Haut nicht penetriert oder erst Metabolisierungsvorgänge (z.B. durch Cytochrom P 450) stattfinden müssen, damit Olaquinox zu einer photoreaktiven Substanz wird.

Die Wichtigkeit einer systemischen Verteilungs- und Metabolisierungszeit belegen die von *Bolling et al. (1981)* beschriebenen Versuche mit der als sekundären Photosensibilisator bekannten Substanz Dacarbazin.

Würden die Tiere im Rahmen des IMDS-Modells unmittelbar nach der oralen Applikation bestrahlt, wären zu diesem Zeitpunkt eventuelle sekundäre Photosensibilatoren möglicherweise noch nicht metabolisiert oder noch auf dem Weg in das Effektororgan Haut.

Aus der Komplexität der Reaktionen ergibt sich, daß *in vitro* Systemen durch die Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen, metabolisierender Enzyme oder fehlender Bindung zu Makromolekülen oft enge Grenzen gesetzt sind. Olaquinox reagiert beispielsweise im 3T3 NRU PT- Test (Neutral Red Uptake Photo Toxicity Test) inert. Man müsste also einem *in vitro* Test entweder synthetisch hergestellte Metaboliten direkt oder ihren Metabolisierungspartner zuführen (Hepetozyten-Test: S9-Mix).

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die Integration der oralen Applikation und der UV-Bestrahlung in das IMDS-Modell eine weitergehende Analyse von Photoreaktionen oral applizierter Substanzen möglich macht. Die Reaktionen auf den photoirritativen Standard 8-MOP und den photoallergischen Standard Olaquinox waren eindeutig mit Hilfe des IMDS-Modells zu detektieren und zu differenzieren.

Wie zu erwarten rief 8-MOP als klassische photoirritative Substanz eine starke Ohrdickenzunahme mit einer relativ geringen Lymphknotenzellzahlzunahme hervor. Olaquinox als rein photoallergische Substanz zeigte, nach oraler Applikation und UV-Exposition eine massive lymphozytäre Reaktion bei einer fehlenden Zunahme der Hautdicke.

Im IMDS-Modell zeigte Olaquinox nach oraler Applikation in allen Konzentrationsstufen zwischen 5 und 100 mg/kgKG ein deutliches und rein photoallergisches Potential. Die Zunahme der Lymphknotenzellzahl erreichte einen maximalen Proliferationsindex von 4,55 bei 50 und 100 mg/kgKG Olaquinox.

Schauder beschrieb erstmals 1993 die Photoallergenität von Olaquinox. Sie trat hauptsächlich bei Schweinezüchtern auf, die bei der Fütterung der Tiere mit dem Wachstumsförderer Olaquinox in Kontakt kamen (*Schauder, 1993*). Olaquinox wird unter Lichteinfluß zu dem reaktiven Oxyziridine umgewandelt.

Kumar et al dokumentierten 1996 eine schwere photoallergische Kontaktdermatitis an den Händen eines australischen Schweinezüchters (*Kumar et al., 1996*). Dies würde die Auslösung der Reaktion durch rein kutanen Kontakt unterstreichen, wobei

andere Autoren eine eher disseminierte Verteilungsform aller lichtexponierten Hautareale beschreiben, also Kopf, Hals, Decolleté und Hände. Schauder ist der Meinung, daß kleinste aerogen, bzw. oral aufgenommene Substanzmengen zur Ausbildung der Photoallergie auf Olaquinox führen.

Die vorgelegten Untersuchungen, wie auch solche an Meerschweinchen (Vohr, 2001, persönliche Mitteilung) deuten darauf hin, daß eine Induktion tatsächlich nur nach oraler Aufnahme (ggf. aerogene Aufnahme von Substanzpartikeln durch Inhalation) möglich ist.

Aufgrund der in den Versuchen gemessenen Reaktionen wurden maximale Werte für die Zunahme der Hautdicke, des Lymphknotenzellzahindexes sowie der prozentuale Anteil der Testreaktion an diesen maximalen Werten bestimmt.

Die definierten Maxima wurden aus Vorversuchen (Ergebnisse aus 25 Experimenten) über die Mittelwerte maximaler Reaktionen bezüglich der Zunahme der Hautdicke und der Zunahme des Lymphknotenzellzahindexes ermittelt und auf ganze Zahlen gerundet. Für die mittlere maximale Hautdicke wurde der Zahlenwert $15 \times 0,01$ mm und für die mittlere maximale Zunahme des Lymphknotenzellzahindexes 5 berechnet.

4.1.1 Flour-Chinolone im IMDS-Modell

Substanzen aus der Gruppe der Flour-Chinolone

Flour-Chinolone gelten als Substanzen, die eine sehr unterschiedliche photoirritative Potenz besitzen und vereinzelt abweichende Reaktionen im Sinne einer Photoallergie hervorrufen (*Kimura, et al, 1998*).

Die Medikamentengruppe der Flour-Chinolone konnte durch die Entwicklung des IMDS-Modell erstmals nach oraler Applikation untersucht werden.

Für die untersuchten Flourchinolone BAY-Y-3118, Ciprofloxacin, Enoxacin, Lomefloxacin, Ofloxacin und Sparfloxacin wurde ihre photoirritative Potenz sowie deren Dosis-Wirkungsbeziehung eindeutig nachgewiesen.

Der Vergleich der IMDS-Quotienten erbrachte die Möglichkeit einer Graduierung des photoirritativen Potentials innerhalb der Flour-Chinolongruppe und erfolgte in die Gruppen stark, mittel und schwach.

Demnach zeigen Lomefloxacin, BAY-Y-3118 und Sparfloxacin ein starkes, Enoxacin ein mittleres und Ofloxacin, Norfloxacin sowie Ciprofloxacin ein schwaches photoirritatives Potential. Aufgrund der leicht differierenden Pharmakokinetik ist eine kleinschrittigere Abstufung der Substanzen nicht sinnvoll und würde die Aussagekraft nicht verstärken.

Die klinischen Erfahrungen bestätigen die hier aufgeführten Ergebnisse. Auf eine Millionen Verschreibungen für Ciprofloxacin kam ein registrierter Fall, für Norfloxacin zwei Fälle, 20 Fälle für Ofloxacin und 70 Fälle für Lomefloxacin (*Food and Drug Administration, 1993*).

Da BAY-Y-3118 während der Phase III-Studie an Probanden zu schweren Verbrennungserscheinungen führte, mußte es aus dem Zulassungsverfahren ausscheiden.

Für Lomefloxacin wurden strenge Warnungen durch die Wechselwirkungen mit Sonnenlicht ausgesprochen und vermerkt.

Horio et al. fanden 1993 in einem Guinea Pig Model ähnliche Ergebnisse. Sie stufen die Phototoxizität wie folgt ein: Enoxacin, Lomefloxacin > Ofloxacin > Norfloxacin, Ciprofloxacin. Die Einschätzung von Enoxacin wäre aufgrund der fehlenden Stellungnahme von Horio zum photoallergischen Charakter noch zu erörtern, da in der Studie nicht zwischen Photoallergie und Photoirritation differenziert wurde.

Um die Möglichkeit eines Transfers des IMDS-Modells auf verschiedene Mausstämme zu testen, damit eine breitere Anwendbarkeit bereitzustellen, wurden Untersuchungen mit BALB/c- und B6C3F1- Inzucht-Stämmen durchgeführt. BALB/c-Mäuse werden beispielsweise häufig in den USA eingesetzt.

Zudem sollte getestet werden, ob diese Mausstämme sensibler auf photoreaktive Substanzen reagieren. Die Analysen wiesen auf veränderte Sensitivitäten während des Priming hin. Da die Parameter Ohrdickenzunahme und Lymphknotenproliferation den Ergebnisse zufolge stammspezifische Maximalwerte vorgeben, muß der IMDS-Quotient anhand dieser Werte errechnet werden.

Der IMDS-DI bezieht sich damit auf den jeweiligen Mausstamm, dessen Ausgangsparameter für jeden Stamm individuell definiert werden müssen. Unter Berücksichtigung der stammspezifischen Maximalreaktionen kann ein vergleichbarer IMDS-Quotient errechnet werden. Die Mindestanforderung der Detektion photoreaktiver Substanzen als auch die Differenzierungsmöglichkeit in Photoallergen und Photoirritans konnte somit für BALB/c- und B6C3F1- Inzucht-Stämme nachgewiesen werden. Damit läßt sich eine Übertragbarkeit des IMDS-Modells auf verschiedene Mausstämme belegen.

4.1.2 Flour-Chinolone mit photoallergischem Potential

Normalerweise treten Flour-Chinolone wie oben erwähnt als Photoirritantien auf. Enoxacin und Ofloxacin stellen im niedrigen Dosisbereich jedoch eine Ausnahme dar. Besonders Enoxacin zeigte in den dargelegten Untersuchungen ein klares photoallergisches Potential mit Differenzierungsquotienten zwischen 2,6 und 26,6 in den Dosisbereichen zwischen 200 und 800 an.

Diese photoallergischen Eigenschaften werden in hohen oralen Dosisbereich vom photoirritativen Charakter der jeweiligen Substanz überlagert. Jene Ergebnisse

waren aufgrund klinischer Beobachtungen von *Kawabe et al.*, (1989) und *Schauder (1990)* bezüglich des photoallergischen Potentials von Enoxacin zu erwarten.

Horio et al. führten 1994 anhand des Guinea Pig Modells den Beweis an, daß Flour-Chinolone photoallergische Eigenschaften besitzen. Eine Aufschlüsselung der Dosisbereiche oder Differenzierung in Flour-Chinolone mit und ohne photoallergischem Potential war jedoch mit dem von *Horio* angewandten Modell nicht möglich.

Oshima et al. (2000) konnten in *in vitro* Versuchen zeigen, daß Flour-Chinolone unter UV-A Exposition von Langerhanszellen gebunden werden und als Photohaptene in der Lage waren, T-Zellen zu sensibilisieren und zu restimulieren. *Tokoryo* testete 1998 die Eigenschaften der Flourchinolone bezüglich ihrer Eigenschaften als Photohaptene im Rahmen eines Maus-Modells. Er beschrieb eine über T_H1-Zellen vermittelte Photoallergie, die bei Flour-Chinolonen vornehmlich über den Vbeta 13 T-Zell-Rezeptor verläuft.

Hieraus ergab sich für ihn die mögliche Schlußfolgerung, daß Flourchinolone das gleiche photoantigene Epitop besitzen, welchen dann von V beta 3⁺ T-Zellen erkannt wird und sogar zu Kreuzreaktionen führen kann. Es bleibt bis dato offen, ob klinische Beobachtungen die These der Kreuzreaktion stärken werden (*Tokura, 1998*). Ein Zusammenhang zwischen *in vitro* Photobindung und *in vivo* Photoallergie ist sehr umstritten (*2nd. ECVAM Workshop, 2000*).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das IMDS-Modell die photoallergischen Eigenschaften einer Substanz zuverlässig, schnell und einfach analysieren kann. Es ist außerdem in der Lage, den Umschlagspunkt, ab dem der photoirritative Charakter einer Substanz überwiegt, zu bestimmen.

In vitro Testverfahren wie die MECLR, Mixed Epidermal Cell Lymphocyte Reaction oder der 3T3 NRU PT-Test sind in der Lage, das photoirritative, nicht aber das photoallergische Potential von Substanzen wie Olaquinox, Enoxacin oder Ofloxacin zu detektieren, so daß der photoallergischer Charakter verdeckt bleibt.

4.2 Das IMDS-Modell zur Untersuchung photoreaktiver Problemsubstanzen

Eine hohe Anforderung an prädiktive Testsysteme stellen Substanzen dar, die in Abhängigkeit vom Applikationsmodus (oral oder dermal) photoallergische oder photoirritative Reaktionen hervorrufen.

Chlorpromazin wird in der Literatur als eine solche Substanz beschrieben. Nach dermalen Applikation bewirkt sie überwiegend eine Photoallergie und nach oraler Applikation ausschließlich eine Photoirritation. Hinzu kommt, daß Chlorpromazin nach oraler Applikation in niedrigen Konzentrationsstufen ein photoallergisches Potential aufweist.

Nach dermalen Applikation 3 bis 20 %-iger Chlorpromazin-Lösungen lagen alle berechneten IMDS-Differenzierungsquotienten im Bereich photoallergischer Reaktionen.

Im IMDS-Modell betrug der Differenzierungsquotient nach oraler Applikation von 25 mg/kgKG Chlorpromazin 3,47. Ab 50 mg/kgKG aufwärts lag der IMDS-DI unter eins und damit im Bereich der Photoirritation. Dieser von *Jung* bereits klinisch beschriebene Umschlagpunkt bei oraler Applikation der Substanz war mit Hilfe des IMDS-Modells nachzuvollziehen und in den bestimmten Dosisbereichen für das Maussystem (NMRI-Stamm) zu dokumentieren.

Jung (1977) hat folgende Erklärung für diesen Sachverhalt: Durch Lichteinwirkung bildet sich unter Abspaltung des Chlors ein langlebiges Radikal. Reagiert dieses nun mit der DNS, so kommt es zu einer photoirritativen Hyperpigmentierung, die aufgrund von Beobachtungen durch Ippen aber auch durch Reaktion des Radikals mit Melanin oder dessen Vorstufen zustande kommen kann.

Bei topischer Anwendung von Chlorpromazin setzt sich ein durch Licht erzeugtes Chlorpromazin-Radikal dagegen mit Hautproteinen um, die dann als Photohaptene bzw. Antigene eine photoallergische Reaktion hervorrufen (*Jung, 1977*).

Die unterschiedlichen photobiologischen Eigenschaften einer Substanz nach dermalen oder oraler Applikation können nun mit Hilfe eines einzigen Testverfahrens, nämlich dem IMDS-Modell untersucht und analysiert werden.

Dieses einheitliche Testverfahren für dermale und orale Substanzapplikation ist besonders bei Medikamenten wie Antibiotika (beispielsweise Gentamicin) wichtig, die als Lokal- und Systemtherapeutika eingesetzt werden.

4.3 Lokale immunologische Reaktionen

Da das IMDS-Modell eine Differenzierung anhand der immunologischen Reaktionen während der Induktionsphase einer Photoreaktion ermöglicht, konnten photoallergische und photoirritative Reaktionen erstmals auf zellulärer und molekularer Ebene vergleichend untersucht werden, ohne daß die untersuchten Zellen auf unterschiedliche Art und Weise gewonnen werden mußten.

Obwohl intensive Untersuchungen zur Pathogenese des photo-/irritativen Reaktionstyps als reversible inflammatorische Hautreaktion ohne spezifische immunologische Ausprägung durchgeführt wurden, bleiben noch viele Mechanismen ungeklärt (*Corsini et Galli, 1998*).

Homey und Blümel et al. zeigten 1998 und 1999, daß irritative Hautreaktionen trotz des antigenunabhängigen Charakters nicht nur durch eine markante epidermale inflammatorische Hautreaktion, sondern auch durch die Aktivierung der hautdrainierenden Lymphknoten charakterisiert sind.

Im Gegensatz zu früheren Studien (*Brasch et al, 1992 und Enk et Katz, 1992*), die sich ausschließlich auf die zellulären und molekularen Ereignisse in der Haut konzentrierten, wiesen ebenfalls die Untersuchungen von *Montelius et al., 1994* auf die Begleitreaktion, dem sogenannten Bystander-Effekt im lokal drainierenden Lymphknoten hin. Dieser findet, wenn auch zeitverzögert, im Rahmen jeder inflammatorischen Reaktion statt und äußert sich in der Proliferation der lokal drainierenden Lymphknoten. Übereinstimmende Ergebnisse wurden auch von *Montelius et al., (1994), Homey et al., (1998) und Blümel et al., (1999)* gezeigt.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit verdeutlichen diese Beobachtungen anhand des Lymphknotenproliferationsindex in Abhängigkeit von der Ohrdickenzunahme und beweisen die Übertragbarkeit der o.g. Beobachtungen auf photoirritative Reaktionen. Alle untersuchten photoirritativen Substanzen zeigten bei einer signifikanten Ohrdickenzunahme eine Proliferation der lokal drainierenden Lymphknoten.

Durch das Expressionsverhalten der Oberflächenmoleküle immunologisch kompetenter Zellen der Haut und des lokal drainierenden Lymphknotens konnten Schlüsselreaktionen auf molekularer Ebene beobachtet werden.

8-MOP, Lomefloxacin und Sparfloxacin führten zu einer Hochregulation von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sowie der costimulatorischen Moleküle CD54, CD80 und CD86 auf I-A⁺ Zellen. Dieses Phänomen war vor allem in der Haut, aber auch im lokal drainierenden Lymphknoten zu beobachten.

Weiter zeichnete sich insbesondere nach der oralen Applikation von 8-MOP eine massive Infiltration von CD11b⁺/I-A⁻ Zellen (Granulozyten) in die Epidermis ab.

Durchflußzytometrisch konnte demnach ein leukozytäres epidermales Zellinfiltrat, bestehend aus rezirkulierenden T_H-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in der Epidermis), Granulozyten (CD11b⁺/I-A⁻ Zellen) und Makrophagen (CD11b⁺/I-A⁺ Zellen) als charakteristisches Merkmal der inflammatorischen Hautreaktion nachgewiesen werden.

Eine direkte stimulierende Wirkung von irritativen und photoirritativen Substanzen, die z.B. über das Lymphgefäßsystem in den Lymphknoten gelangen kann, scheint daher nicht, wie an einigen Stellen diskutiert, die Ursache der Lymphknotenproliferation zu sein.

Zusammenfassend betrachtet, lag der morphologische, zelluläre und molekulare Reaktionsschwerpunkt der Photoirritation insgesamt in der Epidermis.

Hiermit wurden (immun-) histologische Untersuchungen von *Skoog (1989)*, *Gawkrodger et al., (1986)* und *Brasch et al., (1992)* bestätigt, die aktivierte Gedächtnis-T-Zellen, mononukleäre Zellen (eosinophile, neutrophile und in geringerem Maße auch basophile Granulozyten) und Makrophagen als dominierende Bestandteile des leukozytären Zellinfiltrats in der Epidermis identifizierten.

Friedmann et al. konnten zeigen, daß die Induktion und Bindung von CD54 und CD106, zwei Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie, an ihre spezifischen Liganden LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen) und das „Very late antigen“ (VLA-4) den Austritt von Zellen aus dem Blutstrom in das Gewebe (Extravasation) ermöglichen (Beradesca, 1995). Die Bindung von CD62E an CLA⁺ (Cutaneous lymphocyte antigen) T-Zellen bewirkt die kutane T-Zellinfiltration und damit die restriktive gewebsspezifische Ausprägung der inflammatorischen T-Zellreaktion (*Berg et al., 1991*).

Ein weiterer entscheidender Faktor bei der Induktion einer photoirritativen Reaktion ist die lokale Produktion immunregulatorischer Zytokine durch epidermale Zellpopulationen, insbesondere durch Keratinozyten und Langerhanszellen (*Corsini et al., 1998*). Die Stimulation von Langerhanszellen konnte im Rahmen der vorgelegten Arbeit durch den Oberflächenmarker CD11c auf I-A⁺ Zellen beobachtet werden.

Marks et al., (1987) und *Scheynius et al., (1992)* konnten eine Reduktion der epidermalen Langerhans Zellpopulation infolge eines irritativen Stimulus beobachten. Bisher war es nicht möglich, diese Reduktion eindeutig der Migration der Langerhanszellen zuzuschreiben, sondern es wurde auch die Möglichkeit diskutiert, daß es sich hierbei um die Folge eines direkten zytotoxischen Effekts des Irritans handelt (*Mikulowska et Falck, 1994*).

Brand et al., (1993, 1995) konnten während irritativer Reaktionen eine gesteigerte Zahl epidermaler Langerhanszellen und Zellkontakte zwischen Langerhans und aktivierten T-Zellen in der Lymphe nachweisen, was auf eine Migration epidermaler Langerhanszellen in Richtung der hautdrainierenden Lymphknoten hindeutet.

Aktivierte Langerhanszellen können jedoch aufgrund des antigenunabhängigen Charakters der irritativen Reaktion nur das Signal II bereitstellen, welches aber in Verbindung mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, z. B. IL-1, ebenfalls eine, wenn auch unspezifische Aktivierung der immunologischen Effektorzellen hervorrufen kann (*Brand et al., 1995*). Aus dieser zytokinvermittelten Reaktion resultiert der sogenannte Bystander-Effekt.

Sowohl das von Keratinozyten produzierte TNF-alpha (*Enk et Kratz, 1992*) als auch das von Langerhanszellen gebildete IL-1 beta (*Dustin et al., 1986*) induzieren die Expression von chemotaktischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen und ermöglichen so die oben beschriebene chemotaktische Extravasation des inflammatorischen Zellenfiltrats.

Blümel et Vohr (1999) konnten anhand eines Vergleichs von IL-4 transgenen und Wildtyp-Mäusen erstmals zeigen, daß die epidermale Genexpression aller drei primären proinflammatorischen Zytokine IL-1 beta, TNF-alpha und des chemotaktischen Zytokin MIP-2 (funktional homolog zum humanen IL-8) bei irritativen Reaktionen markant induziert werden.

Sie konnten zudem nachweisen, daß die Migration der Langerhanszellen, die für die Antigen- spezifische Induktion elementar wichtig ist, ausschließlich über das Verhältnis dieser Zytokine zueinander reguliert wird.

Zusammenfassend resultiert die Ohrdickenzunahme als Folge der o.g. zellulären Infiltration und andererseits der interzellulären Ödembildung (*Gad et al., 1986*). Die Ergebnisse zeigen, daß die mit Hilfe der Mikrometerschraube (Oditest) objektivierbare Ohrdickenzunahme mit dem photoirritativen Potential einer Substanz korreliert und unter Einbeziehung der Lymphknotenproliferation eine objektive Aussage über die Stärke der photo-/irritativen Reaktion ermöglicht.

Untersuchungen des photoallergischen Standards Olaquinox legten dar, daß die epidermale Reaktion auf morphologischer, zellulärer und molekularer Ebene während der Induktionsphase photoallergischer Reaktionen im Vergleich zu photoirritativen stark reduziert ist.

Die, im Vergleich zur photoirritativen Reaktion gesteigerte Aktivierung der hautdrainierenden Lymphknoten bei photoallergischen Reaktionen manifestierte sich morphologisch augenfällig in einer Induktion der Lymphknotenproliferation, die nach Untersuchungen von *Kimber et Weisenberger (1989)* und *Vohr et al., (1994)* eng mit dem sensibilisierenden Potential des verwendeten Allergens korreliert. Auf zellulärer Ebene konnte in der Arbeit anhand der Oberflächenexpression von CD25 (IL-2 Rezeptor alpha Kette) durchflußzytometrisch eine deutliche Aktivierung von T_H-Zellen nachgewiesen werden.

IL-2 ist durch Bindung an den IL-2 Rezeptor in der Lage auto- und parakrin eine T-Zellexpansion in Lymphknoten zu induzieren.

Aktivierte T_H Zellen induzieren wiederum mittels IL-5 eine vermehrte Expression von MHC Klasse II Molekülen und steigern dadurch die Proliferationsrate aktivierter B-Zellen (*Holter, 1992; Peyron et Banchereau, 1994*).

Die massive Zunahme des Pan-B-Zellmarkers B220 auf I-A⁺ Zellen konnte bei allen im IMDS-Modell als photoallergisch dokumentierten Reaktionen beobachtet werden.

Insgesamt konnten die Ergebnisse auf zellulärer Ebene zeigen, daß photoallergische Reaktionen in den peripheren Lymphknoten von NMRI-Mäusen eine antigenspezifische Aktivierung und Expansion immunologischer Effektorzellen (T- und B-Zellen) induzieren. Die entscheidende zelluläre Verbindungskomponente zwischen Antigenexposition und Aktivierung der hautdrainierenden Lymphknoten ist die epidermale Langerhans Zellpopulation.

Langerhanszellen gehören zur Familie der aus der hämatopoetischen Zelllinie hervorgehenden antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (Wolff et Stingl, 1983), die nicht nur in der Haut, sondern auch in vielen äußeren Abschlußgeweben des Organismus (z. B.: intestinale oder respiratorische Epithelien) nachgewiesen wurden (*Pavli et al., 1990*).

Hope et al., (1995), Cumberbatch et al., (1995b, 1996) und *Ulrich et Vohr (1996)* konnten zeigen, daß dendritische antigenpräsentierende Zellen, worunter bei kutanen Reaktionen fast ausschließlich Langerhanszellen subsumiert werden, die Hauptquelle für IL-6 während der Induktionsphase kontaktallergischer Reaktionen bereitstellen.

Die in der Arbeit vorgelegten Daten wiesen nach, daß der Prozentsatz der I-A⁺/CD11c⁺ Zellen und die Expression costimulatorischer Moleküle auf antigenpräsentierenden (MHC Klasse II⁺) Zellen während der Induktionsphase der kontaktallergischen Reaktion vor allem in den drainierenden Lymphknoten bei der irritativen Reaktion dagegen in der Epidermis markant erhöht waren.

Die Charakterisierung der murinen Langerhanszellen anhand spezifischer Zelloberflächenmoleküle ist im Vergleich zum Humansystem, in dem CD1a ein spezifisches Zelloberflächenmolekül zur Verfügung steht, nicht mit der gleichen Eindeutigkeit möglich. Allerdings charakterisiert CD11c dendritische Zellen der Maus (*Metlay et al., 1990; Saunders et al.; Maraskovsky et al., 1996*) und I-A MHC Klasse II Moleküle, so daß durch die Kombination beider Oberflächenmarker zuverlässig dendritische Zellen identifiziert werden können.

Da Langerhanszellen die überwiegende Mehrheit der dendritischen antigenpräsentierenden Zellen der Epidermis darstellen, ist die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Charakterisierung über die Kombination dieser beiden Zelloberflächenmoleküle hinreichend genau und ermöglicht eine Aussage über das Vorkommen der Langerhanszellen in den untersuchten Geweben.

Die Induktion der Zelloberflächenexpression costimulatorischer Moleküle (CD54, CD80 und CD86) ist eng an die Maturation der antigenpräsentierenden Langerhanszellen zu potenten immunstimulatorischen dendritischen Zellen gekoppelt. Nur wenn die T-Zellen neben der Antigenpräsentation (Signal I) auch ein zweites Signal über die costimulatorischen Moleküle von den Langerhanszellen erhalten, ist eine effektive T-Zellaktivierung möglich (*Van Severter et al., 1990; Mc Adam et al., 1998*).

Daher erhält man auch über die Zelloberflächenexpression von costimulatorischen Molekülen auf MHC Klasse II⁺ Zellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit anhand von CD54, CD80 und CD86 beobachtet werden konnte, Hinweise auf das Vorkommen aktivierter antigenpräsentierender Langerhanszellen.

Unter Berücksichtigung der genannten Untersuchungen lassen die hier vorgelegten Ergebnisse den Schluß zu, daß aktivierte Langerhanszellen während der Induktionsphase der lokalen kontaktallergischen Reaktion vor allem in den hautdrainierenden Lymphknoten und während der irritativen Reaktion vor allem in der Epidermis zu finden sind.

Es bleibt noch zu klären, welche molekularen Mechanismen für das unterschiedliche Migrationsverhalten epidermaler Langerhanszellen während der Induktionsphase der lokalen photoirritativen oder photoallergischen Reaktion verantwortlich sind. Mehrere Studien konnten erste Hinweise liefern, daß IL-1beta und TNF-alpha für die Induktion der Maturation und Migration epidermaler Langerhanszellen während kontaktallergischer Reaktionen eine wichtige Rolle spielen (*Cumberbatch et al., 1999* und *Blümel et al., 1999*).

Des Weiteren zeigte sich bei Oloquinox eine deutliche Zunahme der Expression des „Very Early Activating Antigen“(CD69) auf CD4⁺ Zellen in den lokal drainierenden Lymphknoten der Haut.

Obwohl die Induktion der Expression von CD69 auf CD4⁺ Zellen als Marker für allergische Reaktionen in der Literatur beschrieben wurde, konnte dies für Enoxacin nur tendenziell nachgewiesen werden. Da Enoxacin im IMDS-Modell alle Merkmale eines schwachen Photoallergens aufweist, bleibt zu diskutieren, ob CD69 nur bei sehr starken Photo-/Allergenen als Marker herangezogen werden kann.

Einige Ergebnisse sprechen dafür, daß eine erhöhte Expression von CD69 tatsächlich auf Antigen spezifische Aktivierung hindeutet. Von einem Fehlen dieses Markers läßt sich hingegen keine Aussage über die Endpunkte der Reaktion ableiten oder gar eine photoallergische Reaktion ausschließen (Vohr, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der Analyse der Induktionsphase der lokalen photoallergischen und photoirritativen Reaktion von NMRI-Mäusen gezeigt werden, daß sowohl die Antigenexposition als auch die Applikation eines Irritans zur Aktivierung und Reifung epidermaler Langerhanszellen zu immunstimulatorischen Zellen führt. Nur die antigenabhängige Induktion der photoallergischen Reaktion führt jedoch zu einer deutlich vermehrten Migration der aktivierten Zellen der Haut in die drainierenden Lymphknoten.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Testsystem zur Detektion photoreaktiver und Differenzierung photoallergischer und photoirritativer Substanzen nach oraler Applikation vorgestellt. Durch die vergleichende Charakterisierung dieser Reaktionen auf morphologischer, zellulärer und molekularer Ebene konnte die Interaktion zwischen Haut als Reaktionsort und den hautdrainierenden Lymphknoten als peripheres Zentrum des Immunsystems während photoirritativer und photoallergischer Reaktionen aufgeklärt werden. Zudem konnte die wichtige Rolle metabolisierender Enzyme im Entstehungsmechanismus photoreaktiver Stoffe dargestellt werden.

Eine notwendige Validierung des IMDS-Modells durch verschiedene Labore mit NMRI-Mäusen und anderen Mausstämmen wird derzeit durchgeführt. Für die immuntoxikologische Risikoprüfung ist dabei die einfache und zuverlässige Anwendbarkeit sowie die Übertragbarkeit auf andere Mausstämmen von besonderem Interesse.

Die in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Photoreaktivität sehr intensiv bearbeitete Substanzgruppe der Flour-Chinolone wird aufgrund ihres klinischen Erfolges weiter einen breiten Absatz finden. Die Entwicklung wird zu nebenwirkungsärmeren und damit auch weniger photoreaktiven Stoffen gehen. Das IMDS-Modell könnte hierzu in der frühen Entwicklungsphase einer neuen Substanz zu deren positiver Entwicklung hinsichtlich immuntoxikologischer Nebenwirkungen beitragen.

Insgesamt sollte das IMDS-Modell aufgrund seiner Struktur auch auf die Möglichkeit der Überprüfung therapeutischer Arzneimittel und Methoden gegen Photoirritationen und Photoallergien in Betracht gezogen werden.

Da das IMDS-Modell auf andere Mausstämmen (Wildtyp-Mäuse und IL-4 transgene Mäuse, Blümel et al, 1999) übertragbar ist, eignet es sich auch zu weitergehenden Analysen der Pathophysiologie atopischer Hauterkrankungen sowie zur Analyse neuer Therapieansätze. Insbesondere die Interaktion zwischen Haut als primären Reaktionsort, z.B. der atopischen Dermatitis und den hautdrainierenden

Lymphknoten als peripheres Zentrum des Immunsystems lassen sich in diesem experimentellen Modell im Gegensatz zum Humansystem oder *in vitro* Modellen gut untersuchen.

Vor allem die Identifizierung der molekulare regulatorischen Mechanismen, welche das Migrationsverhalten antigenpräsentierender Langerhanszellen entscheidend prägen, ermöglicht weiterführende Arbeiten. Die Unterschiede in der epidermalen Zytokinbalance (IL-1beta und TNF-alpha/MIP-2) als eventuelle molekulare Marker zur Differenzierung zwischen photo-/allergischen und photo-/irritativen Reaktionen sind von besonderem Interesse.

Im Rahmen des IMDS-Modells könnten weitere Experimente mit einem breiten Spektrum von photo-/allergischen und photo-/irritativen Standardsubstanzen klären, ob sich in Analogie zum IMDS-Differenzierungsindex (*Blotz et al., 2000*) ein Differenzierungsquotient definieren läßt, welchem das Verhältnis der epidermalen Genexpression dieser drei regulatorischen Zytokine zugrunde liegt.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt mit dem IMDS-Modell (Integrated Model for the Differentiation of chemical-induced allergic and irritant Skin reactions) erstmals ein *in vivo* Testsystem zur prädiktiven Erfassung und Differenzierung photoreaktiver Substanzen nach oraler Applikation vor.

Voranalysen legten dar, daß Photo-/ Kontaktallergene ohne die Auslösung inflammatorischer Reaktionen der Haut zu einer signifikanten Zunahme der Lymphknotenzellproliferation führen, Photo-/ Irritantien jedoch erst nach Auslösung massiver inflammatorischer Reaktionen der Haut eine signifikante Lymphknotenproliferation erzeugen. Die aus diesen Pathomechanismen resultierenden immunologischen Endpunkte der Haut (Ohrdickenzunahme) und der lokal drainierenden Lymphknoten (Lymphknotenzellzahl) ermöglichen die Berechnung des IMDS-Differenzierungsindex (IMDS-DI). Ein IMDS-DI größer eins zeigt eine photo-/allergische und kleiner eins eine photo-/irritative Reaktion auf die Testsubstanz an.

Untersuchungen mehrerer Flour-Chinolone zeigten, daß nicht nur eine Detektion des photoirritativen Charakters, sondern auch die Graduierung des photoirritativen Potentials innerhalb einer Substanzgruppe möglich ist. Demnach zeigen Lomefloxacin, BAY-Y-3118 und Sparfloxacin ein starkes, Enoxacin ein mittleres und Ofloxacin, Norfloxacin sowie Ciprofloxacin ein schwaches photoirritatives Potential. Analysen von Enoxacin und Ofloxacin legten ferner dar, daß einzelne Flour-Chinolone in niedrigen Konzentrationsbereichen photoallergische Eigenschaften besitzen und die Schwellenkonzentration zu einer photoirritativen Reaktion mit Hilfe des IMDS-Modells zu detektieren ist. Die Ergebnisse bestätigen damit klinische Studien und Beobachtungen. Einige Substanzen wie beispielsweise Chlorpromazin reagieren nach dermalen Applikation als Photoallergen und nach oraler als Photoirritans.

Das vorgelegte IMDS-Modell erfaßte diesen problematischen klinischen Sachverhalt für die jeweilig untersuchten Substanzkonzentrationen und ist damit in der Lage unterschiedliche Reaktionsweisen nach dermalen und oraler Applikation aufzudecken. Insgesamt ist das IMDS-Modell schnell (4 Versuchstage), zuverlässig, objektiv (meßbare Parameter, keine subjektive Erythemeinschätzung) und kostengünstig (geringer Tierverbrauch).

Durchflußzytometrisch konnte anhand der vergleichenden Analyse von Zelloberflächenmarkern auf Epidermiszellen ein leukozytäres Infiltrat, bestehend aus rezirkulierenden T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen in der Epidermis), Granulozyten ($CD11b^+/I-A^-$ Zellen) und Makrophagen ($CD11b^+/I-A^+$ Zellen) als charakteristisches Merkmal der inflammatorischen Hautreaktion nach Photoirritationen nachgewiesen werden. In den lokal drainierenden Lymphknoten wurde anhand der Betrachtung der Oberflächenmoleküle CD25 (IL-2 Rezeptor alpha Kette) und CD69 (Very Early Activation Antigen) auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie der costimulatorischen Moleküle CD54, CD80 und CD86 auf $I-A^+$ Zellen (MHC Klasse II⁺) eine geringfügige Aktivierung beobachtet.

Im Rahmen photoallergischer Reaktionen hingegen erfolgte in den lokal drainierenden Lymphknoten der Haut eine antigenspezifische Aktivierung und Expansion immunologischer Effektorzellen (T- und B-Zellen), welche anhand von CD25 auf $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen sowie B220 auf $I-A^+$ Zellen dokumentiert wurde. Die Untersuchungen der Photoallergene konnten ferner zeigen, daß die entscheidende zelluläre Verbindungskomponente zwischen Antigenexposition und Aktivierung der hautdrainierenden Lymphknoten die epidermalen Langerhanszellen sind. Der Prozentsatz der $I-A^+/CD11c^+$ Zellen (Langerhanszellen) und die Expression costimulatorischer Moleküle (CD54, CD80 und CD86) auf antigenpräsentierenden MHC Klasse II⁺ Zellen ($I-A^+$) waren während der Induktionsphase der photoallergischen Reaktion vor allem in den drainierenden Lymphknoten bei der irritativen Reaktion dagegen hauptsächlich in der Epidermis markant erhöht.

Das vorgestellte Modell ermöglicht erstmals die vergleichende Analyse immunologischer Pathomechanismen photoirritativer und photoallergischer Reaktionen in einem einheitlichen Testsystem.

7. Literaturverzeichnis

- Allen, J. E., 1993. Drug induced photosensitivity. Review, Clin Pharm, 1993, Aug;12(8):580-7.
- Avnstorp, C., Balslev, E., and Thomson, H. K., 1989. The occurrence of different morphological parameters in allergic and irritant patch test reactions, Current topics in contact dermatitis. HRSG.: Frosch, P. J., Dooms-Goossens, A., Lachapelle, J., Rycroft, R. J.G. et Scheper, R. J., Springer, Heidelberg: 38-41.
- Basketter, D. A., Scholes, E. W., Kimber I., Botham, P. A., Hilton, J., Miller, K., Robbins M. C., Harrison, P. T. C., Waite, J. S., 1991. Interlaboratory Evaluation of the Local Lymph Node Assay with 25 Chemicals and Comparison with Guinea Pig Test Data, Toxicology Methods, Vol1, No.1.
- Bech-Thomson, N., Wulf H. C., 1994. A polychromatic action spectrum for photosensitivity to orally administered 8-methoxypsoralen in humans, Clinical and Experimental Dermatology, 19, 12-15.
- Beradesca, E. et Distanto, F. 1995: Mechanisms of skin irritation. Irritant dermatitis. New clinical and experimental aspects. Hrsg.: Elsner, P. & Maibach, H. I. Karger, Basel: 1-8.
- Berg, E. L., Yoshino, T., Rott, L. S., Robinson, M. K., Warnock, R. A. Kishimoto, T. K., Picker, L. J. et Butcher, E. C., 1991: The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. J: Exp. Med., 174: 1461-1466.
- Blotz, A., Blümel, J., Ahr, H. J. and Vohr, H.-W., 1998. Analyses of dermal photoreactivity after oral application of Fluoroquinolones with the IMDS. Immunobiol., 199: 533.
- Blotz, A., Blümel, J., Ahr, H. J. and Vohr, H.-W., 1998. Analyses of dermal photoreactivity after oral application of Fluoroquinolones with the IMDS. 29. Annual Meeting of the German Society of Immunology, Freiburg.
- Blotz, A., Michel, L., Moysan, A., Blümel, J., Dubertret, L., Ahr, H. J. & Vohr, H.-W., 2000. Analyses of cutaneous Fluoroquinolones Photoreactivity using Integrated Model for the Differentiation of Skin Reactions. J Photochem Photobiol B. ,10;58(1):46-53.
- Blümel, J., Schimpl, A., Ulrich, P., Ahr, H. J. et Vohr, H.-W., 1999. Primary immune response in skin and skin-associated lymphoid tissue of Interleukin-4-transgenic mice Eur. Cytokine. Netw ,10.
- Bolling, R., Meyer-Hamme S., Schauder, S., 1981: Tägliche Praxis 22-1, 169-171.
- Bos, J., D. and M. L. Kapsenberg, 1993. The skin immune system: progress in cutaneous biology. Immunol. Today 14:75.

- Brasch, J, Burgard J, Sterry W., 1992. Common pathogenetic pathways in allergic and irritant contact dermatitis, J Invest Dermatol. 2;98(2):166-70.
- Brasch, J., Burgard, J. et Smrry, Y., W., 1992. Common pathogenic pathways in allergic and irritant contact dennatitis.I: Invest. Dermatol., 98: 166-170.
- Bühler, E. V., 1965. Delayed contact hypersensitivity in guinea pig. Arch. Dermatol. 91:171.
- Burry, J. N., Crosby, R. W. I., 1966. A case of phototoxicity to nalidixic acid. Med. J. Aus. 2, 698.
- Chamberlain et Basketter, 1996. The local lymph node assay: status of validation. Food Chem Toxicol. 10;34(10):999-1002.
- Chamberlain, M., Hilton, J., Botham, P., Basketter, D. A., Scholes, E. W., Miller, K., Robbins, M., C., Harrison, P., T., C., Gray, T., J., B. and Waite, S., J., 1991. The murine local lymph node assay. Results of an inter-laboratory trial, Toxicol. Lett. 55, 203.
- Corsini, E. et Galli, C. L., 1998. Cytokines and irritant contact dermatitis. Toxicol. Lett., 102-103:277-282.
- Cumberbatch, M., Drarman, R. J. & Kimber, I., 1999b. Langerhans Cell migration in mice requires intact type I Interleukin 1 receptor (IL-1R) function. Arch. Dermatol. Re, 291: 357-361.
- De Leo, V., A. , Horlick H., Hanson D., Eisinger M., Harber L. C., 1984. Ultraviolet radiation induces changes in membrane metabolism of human keratinocytes in culture. J Invest Dermatol 11;83(5):323-6.
- Duffy, P., A., Bennett A., Roberts M., Flint O. P, 1987. Prediction of phototoxic potential using human A431 cells and mouse 3T3 cells. Mol Toxicol. 88, Fall;1(4):579-87.
- Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello.O, C. A. et Springer, T. A., 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-I). J. Immunol., 137: 245-254.
- Edwards, S. M., Donnelly, T. A., Sayre, R. M., Rheins, L. A., Spielmann, H., Liebsch, M., 1994. Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 10(3):111-117, 1994. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 10(5):226.
- Enk, A. H. et Katz, S. I., 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1398- 1402.
- Enk, A. H. et Katz, S. I., 1992. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,89: 1398- 1402.

- Enk, A. H. et Katz, S. I., 1995. Contact sensitivity as a model for T-cell activation in skin. *J Invest. Dermatol.* 7/1995;105(1 Suppl.):80-83.
- Food and Drug Administration, 1993. FDA committee urges stronger warnings on Searl's Maxaquin. *SCRIP* 1810/11:32.
- Fritsch, P., 1998. *Buch der Dermatologie und Venerologie.*
- Gawkrodger, D. J., Mc Viltie, E., Carr, M. M., Ross, J. A. et Hunter, J. A. A., 1986. Phenotypic characterization of the early cellular responses in allergic and irritant contact dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 66: 590-598.
- Gawkrodger; D. J., E. Mc Vittie, M. M. Carr, J.A. and Ross, 1986. Phenotypic characterisation of the early cellular responses in allergic and irritant contact dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 66:590.
- Gould, J.W., Mercurio, M.G., Elmetz, C.A., 1995. Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *Dermatology* 1995-33-4, 551-573.
- Groves, R., W., Allen M. H., Ross E. L., Barker J. N., Mac Donald D. M. 1995. Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br J Dermatol* Mar;132(3):345-52.
- Guidici, P., A., Maguire H.C. 1985. Experimental photoallergy to systemic drugs. *J Invest Dermatol* 55: 207-211.
- Haen, E., Pryzbilla, B., 1988. Phototoxizität und Photoallergie. *Münch. med. Wschr.* 130, 23.29-39.
- Harber, I. C., et Brickers, D. R., 1989. Photosensitivity diseases. Principles of diagnosis and treatment. 2nd ed Decker, Toronto Philadelphia.
- Hawk, J. L. M. et Magnus, I. A., 1979. Chronic actinic dermatitis- an idiopathic photosensitivity syndrome including actinic reticuloid and photosensitive eczema. *Br. J. Dermatol.* 101 (Suppl. 17):24.
- Hoelzle, E., Neumann, H., Hausen, B., 1991. Photopatch testing: the 5-year experience of the German Austrian and Swiss photopatch test group. *J. Am. Acad. Dermatol.* 25, 59-68.
- Holter, W., 1992. Regulation of Interleukin 4 production and of Interleukin 4-producing cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 98: 273-278.
- Homey, B., v. Schilling, C., Blümel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. and Vohr, H. W., 1998. Development of an Integrated Model for the Differentiation of chemical-induced allergic and irritant Skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharm.* 153: 83-94.
- Horio, T., Miyauchi, H., Asada, Y., Aoki, Y., Harada, M., 1994. Phototoxicity and photoallergenicity of quinolones in guinea pigs, *J Dermatol Sci* Apr;7(2):130-5.

- Ippen, H., 1993 Photoirritative und photoallergische Reaktionen: Möglichkeiten der Risikoabschätzung in der präklinischen und klinischen Entwicklung, Allergische und pseudoallergische Reaktionen, Merck-Verlag, S. 37-45.
- Izu R., Gardeazabal J., Gonzalez M., Landa N., Raton J. A., Diaz-Perez J. L., 1992. Enoxacin-induced photosensitivity: study of two cases. *Photoderm., Photoimmunol. & Photomed.* 9(2): 86-88.
- Jensen, F, Foote C. S., 1987. Chemistry of singlet oxygen-48. Isolation and structure of the primary product of photooxygenation of 3,5-di-t-butyl catechol. *Photochem Photobiol. Sep*;46(3):325-30.
- Johnson, B. J., Furguson, J., 1990. Drug and Chemical Photosensitivity, *Seminars in Dermatology*, Vol 9, No.1, , pp 39-46.
- Jung, E. G., 1977. Mechanisms of photoallergies, *Arzneimittelforschung* 27(96): 1868-70.
- Jung, E. G., Bay, F. A.: 1969. *Arch. klin. exp. Derm.* 235, 308.
- Jung, E., 1995. *Dermatologie*, Hippokrates Verlag.
- Kampgen, E., Koch, N., Koch, F., Stoger, P., Heufler, C., Schuler, G., Romani, N., 1991. Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, Apr. 15;88(8):3014-8.
- Kang, J., S., Kim, T., H., Park, K., B., Chung, B., H., Youn, J., I., 1993. Enoxacin photosensitivity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* Aug;9(4):159-61.
- Kimber, I. and Weisenberger, C., 1989. A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. Assay development and result of an initial validation study. *Arch. Toxicol.* 63,274.
- Kimber, I., 1989. Aspects of the immune response to contact allergens: opportunities for the development and modification of predictive test methods. *Food Chem. Toxicol.* Nov;27(11):755-62.
- Kimura, M., Kawada A., 1998. Photosensitivity induced by lomefloxacin with cross-photosensitivity to ciprofloxacin and fleroxacin. *Contact Dermatitis* , Mar;38(3):180.
- Kumar, A., Freeman S., 1996. Photoallergic contact dermatitis in a pig farmer caused by Olaquinox. *Contact Dermatis*, 35, 249.
- Kunze, J., Roeber, H., Kollakowski, M., 1980. Photoirritative Dermatitis unter DITC-Behandlung, *Z. Hautk.* 55(2).
- Lagey, K., Duinslaeger, L., Vanderkelen, A., 1995. Burns induced by plants. *Burns*, Vol.21, No.7, 542-543.

- Lens, J. W., H. A. Drexhage, W. Benson, and B. M. Balfour, 1983. A study of cells present in lymph draining from a contact allergic reaction in pigs sensitized to DNFB. *Immunology* 49:415.
- Liebsch, M., Barrabas, C., Traue, D. et Spielmann, H., 1997. 14,4, 165-174.
- Magnusson, B. et Klingman, A. M., 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea maximization test. *J. Invest. Dermatol.* 52:268.
- Maguire, H., C., Kaidbey K. 1982. Experimental photoallergic contact dermatitis. A mouse model. *J Invest Dermatol.* 79: 147-152.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E. R., Lyman, S. D., Shortman, K., McKenna, H.J., 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med Nov* ,1;184(5):1953-62.
- Maurer, T., Weigerich E., Hess R. 1980. Predictive animal testing for photocontact allergenicity. *Br. J. Dermatol.* 103. 593-605.
- Maurer, T., 1984. Experimental photocolltact allergenicity: guinea pig models. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1: 221-231.
- Miachy, Y., Takigawa M. 1983. Mechanisms of contact photosensitivity in mice. Predictive testing of chemicals with photoallergic potential in mice. *Arch Dermatol:* 119: 763-741.
- Mobacken, H., Rosen K., Swanbeck G. 1983: Oral psoralen photochemotherapy of hyperkeratotic dermatitis of the palms. *Br. J. Dermatol.* 109-. 205-208.
- Montelius, J., Wahlkvist, H., Boman, A., Fernstrom, P., Grabergs, P. et Wahlberg, J.-E. 1994. Experiences with the murine local lymph node assay: Inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Derm. Venereol.*, 74: 22-27.
- Neumann, N. et Lehmann, P., 2001. *Photodermatosen. Ein Leitfaden zur Diagnostik, Steinkopf, Darmstadt.*
- Oakley, A., Wyllie K., 1996. A review of ultraviolet treatment for psoriasis at Waikato Hospital., *Australasian Journal of Dermatology*, 37, 132-136.
- Ohshima, A, Seo N, Takigawa M, Tokura Y. 2000. Formation of antigenic quinolone photoadducts on Langerhans cells initiates photoallergy to systemically administered quinolone in mice. *J. Invest. Dermatol.* Mar;114(3):569-75.
- Pape, W. J., 1997. Validation of *in vitro* methods to single out photoirritants using mechanistically based tests. *Arch. Toxicol. Suppl.*;19:239-47. Review. *Arch. Toxicol. Suppl.* 19:239-47.
- Paul, W. E., J. O'Hara. 1987. B-cell stimulatory factor-1 linterleukin 4. *Annu. Rev. Immunol.* 5:429-459.

- Pavli, P., Woodhams, C. E., Doe, W. F. et Hume, D. A., 1990. Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology*, 70: 40-47.
- Pendlington, R. U., Barrat, M. D., 1990. Molekular basis of photocontact allergy. *Intern. J. of Cosmetic Science*. 12, 91-103.
- Peterkin, G. G., 1945. Sulphonamide rashes. An analysis of 500 cases in North Africa and Italy. *Brit. Med. J.* II:1.
- Peyron, E. et Banchereau, J., 1994. Interleukin 4. Structure, function and clinical aspects. *Eur. J. Dermatol.*, 4: 181-188.
- Pier, G., Ortel, B., Carlino, A. M., Honigsmann., H., De Panfilis, G., 1993. *J. of the Am. Acad. of Derm.*, Vol 28, No.4.
- Pigatto, P. D., Legori A., Bigardi A. S., Guarrera M., Tosti A., Santucci B., Monfrecola G., Schena D., 1996. Gruppo Italiano Ricerca Dermatiti da Contatto ed Ambientali Italian Multicenter, Study of Allergic Contact Photodermatitis: epidemiological aspects. *Am J Contact Dermat Sep*;7(3):158-63.
- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A., Shortman, K., 1996. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* Dec 1;184(6):2185-96.
- Schauder, S., 1990. Photosensitivity following enoxacin and xipamide: combined phototoxic and photo-allergic reaction to enoxacin, photo-allergic reaction to xipamide with subsequent transient light reaction. (Article in German). *Z Hautkr.* Mar;65(3):253-62.
- Scholes, E. W., Basketter, W. W., Sarll, E., Kimber, Evans, C., D., Miller, K., Robbins, M., C., Harrison, P., T., C., and Waite, S., J., 1992. The local lymph node assay: results of a final interlaboratory validation under field conditions. *J. Appl. Tox.* 12, 217.
- Scholes, E.W., Basketter, D. A., Lovell, W. W., Sarll, A. E., Pendlington, R. U., 1992. The identification of photoallergenic potential in the local lymph node assay. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 8, 249-254.
- Schothorst, A., A, van Steveninck J., Went L. N. , Suurmond D., 1972. Photodynamic damage of the erythrocyte membrane caused by protoporphyrin in protoporphyria and in normal red blood cells. *Clin. Chim. Acta.*, Jun;39(1):161-70.
- Shimoda, K., Yoshida, M., Wagai, N., Takyama, S., Kato, M., 1993. Phototoxic Lesions Induced by Quinolone Antibacterial Agents in Auricular Skin and Retina of Albino Mice, *Toxicol. Pathol.*21-6. 554-561.
- Skoog, M. L. 1980. Measurement and differentiation of the cellular infiltrate in experimental toxic contact dermatitis. *Acta Derm. Venereol.*, 60: 239-244.

- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. H., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Casto, M., Sładowski, D., Steiling, W., Brantom, P., 1997. EU/COLIPA „*In vitro* phototoxicity“ validation study, results of phase 2, part 1: the 3T3 phototoxicity test. *Toxicology in vitro*.
- Spielmann, H., Liebsch, M., Pape, W. J., Balls, M., Dupuis, J., Klecak, G., Lovell W. W., Maurer T., De Silva O., Steiling W. 1995, EEC/COLIPA *in vitro* photoirritancy program: results of the first stage of validation, *Curr Probl Dermatol*;23:256-64.
- Spielmann, H., Liebsch, M., Pape, W. J., Balls, M., Dupuis, J., Klecak, G., Lovell, W. W., Maurer, T., De Silva, O., Steiling, W., 1995. EEC/COLIPA *in vitro* photoirritancy program: results of the first stage of validation. *Curr. Probl. Dermatol.* 23:256-64.
- Spielmann, H., Lovell, W.W., Hoelzle, E., Lohson, B.E., Maurer, T., Miranda, M., Pape, W.J. W., Sapora, O., Sładowski, D., 1994. *In vitro* phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 2. *ATLA* 22, 314-348.
- Thèze, J., *Encyclopedia of Immunology*, 2nd Edition
- Tokura, Y., 1998. Quinolone photoallergy: photosensitivity dermatitis induced by systemic administration of photohaptenic drugs. *J. Dermatol. Sci. Sep*;18(1):1-10. Review.
- Ulrich, P., Homey, B. and Vohr, H.W., 1997. A modified local lymph node assay for the differentiation of contact photoallergy from phototoxicity by analysis of cytokine expression in skin-draining lymph node cells. *Toxicology*.
- Ulrich, P., Vohr, H.W., 1996. Murine lymph node antigen presenting cells are the main source of interleukin-6 in the initiation of delayed-type hypersensitivity. *Eur. Cytokine. Netw.* 7, 401-407.
- Vohr, H. W., Homey, B., Schuppe, H. C., Kind, P., 1994. Detection of photoreactivity demonstrated in a modified local lymph node assay in mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10, 57-64.
- Vohr, H.-W., Blümel, J., Blotz, A., Homey, B. & Ahr, H. J., 2000. An intra-laboratory validation of IMDS: Discrimination Between (Photo)Allergic and (Photo)Irritant Skin Reactions in Mice, *Arch. Toxicol. Jan*; 73(10-11):501-9.
- Wagai, N. et Tawara, T., 1991. Important role of oxygen metabolites in quinolone antibacterial agent-induced cutaneous phototoxicity in mice, *Toxicology*, 65:495-499.
- Wagai, N., Tawara, K., 1992. Possible direct role of reactive oxygens in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. *Arch Toxicol.*;66(6):392-7.

- Wang, B., Fujisawa H., Zhuang L., Kondo S., Shivji G. M., Kim C. S., Mak T. W., Sauder D,N,. 1997: Depressed Langerhans cell migration and reduced contact hypersensitivity response in mice lacking TNF receptor p75. *J Immunol.*, Dec 15;159(12):6148-55.
- Wiessmann, I., Hofmann C., Wagner G., Plewig, G., Braun Falco, O., 1978. PUVA-Therapy for alopecia areata. *Arch. Dermatol. Res.* 262: 333-336.
- Wilkinson, D.S., 1962. Further experiences with halogenated salicylanilides. *Brit. J. Dermatol.* 68:128.
- Wolfson, J., Hooper, D., 1990. *Quinolone Antimicrobiol Agents*, American Societe for Microbiology.
- Yokoyama, W. M., F. Koning, P. J. Kehn, G. M. B. Pereira, G. Stingl, J. E. Coligan, and E. M. Shevach. 1988. Characterization of a cell surface-expressed disulfid-linked dimer involved in murine T -cell activation. *J Immuno*1141:369.
- Yu, H, Wolford, S., T., Kegode, R, Zhao, W, Osweller GD., 1996. Hypericin-induced phototoxicity in cultured fibroblasts and swine erythrocytes. *Photochem Photobiol.*, Jul;64(1):168-73.

Curriculum vitae

Name	Andrea Blotz	
Adresse	Worringerstr. 63, 40211 Düsseldorf	
Geburtsdatum	19.02.1974, Oberhausen	
Familienstand	ledig	
Schulbildung	1980-1984	Astrid-Lindgren-Grundschule, Oberhausen
	1984-1993	Allgemeine Hochschulreife am Bertha-von-Suttner Gymnasium, Oberhausen
Studium	04.1994	Immatrikulation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zum Studium der Humanmedizin
	04.1996	Ärztliche Vorprüfung
	04.1997	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	08.1999	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Famulaturen	08.1999	Department of Dermatology and Venereology, University of Helsinki, sowie kooperative Laborarbeit im Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finnland
	09.1999	Department of Dermatology and Venereology, University of Dundee, England, im Rahmen des Biomed II Projektes der Europäischen Union
Praktisches Jahr	10.1999-09.2000	Praktisches Jahr in den Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	11.2000	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ärztin im Praktikum	seit 1.12.2000	Abteilung für Gesichts- und Plastische Chirurgie, Fachklinik Hornheide an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Publikationen

- Publikationen
- Blotz, A., Blümel, J., Ahr, H. J. & Vohr, H.-W. , 1998. Analyses of dermal photoreactivity after oral application of Fluoroquinolones with the IMDS. Immunobiol., 199: 533.
- Blotz, A., Blümel, J., Ahr, H. J. & Vohr, H.-W., 1998. Analyses of dermal photoreactivity after oral application of Fluoroquinolones with the IMDS. 29. Annual Meeting of the German Society of Immunology, Freiburg.
- Vohr, H.-W., Blümel, J., Blotz, A., Homey, B. & Ahr, H. J., 1999. An intra-laboratory validation of IMDS: Discrimination Between (Photo)Allergic and (Photo)Irritant Skin Reaktionen in Mice, Arch. Toxicol. 2000 Jan; 73(10-11):501-9.
- Blotz, A., Michel, L., Moysan, A., Blümel, J., Dubertret, L., Ahr, H. J. & Vohr, H.-W., 2000. Analyses of cutaneous Fluorquinolones Photoreactivity using Integrated Model for the Differentiation of Skin Reaktionen J. Photochem. Photobiol. 10,58(1): 46-53
- Neumann, N., Blotz, A., Lehmann, P. & Vohr, H.-W.: An inter-laboratory validation of different established test systems, detecting the phototoxic potential of substances; in Vorbereitung



Etablierung und Evaluation des IMDS-Modells zur prädiktiven Erfassung und Differenzierung photoreaktiver Substanzen
Untersuchungen zur Charakterisierung der lokalen immunologischen Reaktionen während primärer photoallergischer und photoirritativer Reaktionen der Haut

Andrea Blotz

Die vorliegende Arbeit stellt mit dem IMDS-Modell (Integrated Model for the Differentiation of chemical-induced allergic and irritant Skin reactions) erstmals ein in vivo Testsystem zur prädiktiven Erfassung und Differenzierung photoreaktiver Substanzen nach oraler Applikation vor. Voranalysen legten dar, daß Photo-/ Kontaktallergene ohne die Auslösung inflammatorischer Reaktionen der Haut zu einer signifikanten Zunahme der Lymphknotenzellproliferation führen, Photo-/ Irritantien jedoch erst nach Auslösung massiver inflammatorischer Reaktionen der Haut eine signifikante Lymphknotenproliferation erzeugen. Die aus diesen Pathomechanismen resultierenden immunologischen Endpunkte der Haut (Ohrdickenzunahme) und der lokal drainierenden Lymphknoten (Lymphknotenzellzahl) ermöglichen die Berechnung des IMDS-Differenzierungsindex (IMDS-DI). Ein IMDS-DI größer eins zeigt eine photo-/allergische und kleiner eins eine photo-/irritative Reaktion auf die Testsubstanz an.

Untersuchungen mehrerer Flour-Chinolone zeigten, daß nicht nur eine Detektion des photoirritativen Charakters, sondern auch die Graduierung des photoirritativen Potentials innerhalb einer Substanzgruppe möglich ist. Demnach zeigen Lomefloxacin, BAY-Y-3118 und Sparfloxacin ein starkes, Enoxacin ein mittleres und Ofloxacin, Norfloxacin sowie Ciprofloxacin ein schwaches photoirritatives Potential. Analysen von Enoxacin und Ofloxacin legten ferner dar, daß einzelne Flour-Chinolone in niedrigen Konzentrationsbereichen photoallergische Eigenschaften besitzen und die Schwellenkonzentration zu einer photoirritativen Reaktion mit Hilfe des IMDS-Modells zu detektieren ist. Die Ergebnisse bestätigen damit klinische Studien und Beobachtungen. Einige Substanzen wie beispielsweise Chlorpromazin reagieren nach dermalen Applikation als Photoallergen und nach oraler als Photoirritans.

Das vorgelegte IMDS-Modell erfaßte diesen problematischen klinischen Sachverhalt für die jeweilig untersuchten Substanzkonzentrationen und ist damit in der Lage unterschiedliche Reaktionsweisen nach dermalen und oraler Applikation aufzudecken. Insgesamt ist das IMDS-Modell schnell (4 Versuchstage), zuverlässig, objektiv (meßbare Parameter, keine subjektive Erythemeinschätzung) und kostengünstig (geringer Tierverbrauch).

Durchflußzytometrisch konnte anhand der vergleichenden Analyse von Zelloberflächenmarkern auf Epidermiszellen ein leukozytäres Infiltrat, bestehend aus rezirkulierenden T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in der Epidermis), Granulozyten (CD11b⁺/I-A⁻ Zellen) und Makrophagen (CD11b⁺/I-A⁺ Zellen) als charakteristisches Merkmal der inflammatorischen Hautreaktion nach Photoirritationen nachgewiesen werden. In den lokal drainierenden Lymphknoten wurde anhand der Betrachtung der Oberflächenmoleküle CD25 (IL-2 Rezeptor alpha Kette) und CD69 (Very Early Activation Antigen) auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie der costimulatorischen Moleküle CD54, CD80 und CD86 auf I-A⁺ Zellen (MHC Klasse II⁺) eine geringfügige Aktivierung beobachtet.

Im Rahmen photoallergischer Reaktionen hingegen erfolgte in den lokal drainierenden Lymphknoten der Haut eine antigenspezifische Aktivierung und Expansion immunologischer Effektorzellen (T- und B-Zellen), welche anhand von CD25 auf CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sowie B220 auf I-A⁺ Zellen dokumentiert wurde. Die Untersuchungen der Photoallergene konnten ferner zeigen, daß die entscheidende zelluläre Verbindungskomponente zwischen Antigenexposition und Aktivierung der hautdrainierenden Lymphknoten die epidermalen Langerhanszellen sind. Der Prozentsatz der I-A⁺/CD11c⁺ Zellen (Langerhanszellen) und die Expression costimulatorischer Moleküle (CD54, CD80 und CD86) auf antigenpräsentierenden MHC Klasse II⁺ Zellen (I-A⁺) waren während der Induktionsphase der photoallergischen Reaktion vor allem in den drainierenden Lymphknoten bei der irritativen Reaktion dagegen hauptsächlich in der Epidermis markant erhöht.

Das vorgestellte Modell ermöglicht erstmals die vergleichende Analyse immunologischer Pathomechanismen photoirritativer und photoallergischer Reaktionen in einem einheitlichen Testsystem.



Prof. Dr. med. P. Lehmann