

Aus der Hautklinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Auslösung primärer und sekundärer
zellulärer Immunantworten durch Chloropalladate
bei der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andrea Wiesenborn

2002

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

**gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger
Dekan**

**Referent: Prof. Dr. P. Lehmann
Korreferent: Prof. Dr. E. Gleichmann**

Herrn Prof. Dr. P. Lehmann danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. E. Gleichmann danke ich für die Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit in Kooperation zwischen dem Institut für Umwelthygiene und der Hautklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.-Chr. Schuppe für die langwierige und zuverlässige Betreuung meiner Arbeit, für die zahlreichen wertvollen Diskussionen und Anregungen, für die gute und produktive Arbeitsatmosphäre im Labor sowie für den freundlichen und kollegialen Umgang miteinander.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Johanna Kulig und Dr. J. Pagels für die Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente.

Nicht zuletzt möchte ich mich bedanken bei meinem Mann und meinen Kindern für das Verständnis, die Rücksichtnahme und Motivation, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit geführt haben.

Insbesondere danke ich meiner Mutter und Schwiegermutter für die langjährig-regelmäßige, tatkräftige Unterstützung, die ich durch sie erfahren habe und die damit wesentlich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS:

1.	EINLEITUNG	2
1.1	PALLADIUM: VORKOMMEN, EIGENSCHAFTEN UND VERWENDUNGSFORMEN	2
1.2	PALLADIUM IN DER GESCHICHTE DER MEDIZIN	5
1.3	GESUNDHEITLICHE AUSWIRKUNGEN VON PALLADIUM IM TIERMODELL	5
1.4	GESUNDHEITLICHE AUSWIRKUNGEN VON PALLADIUM BEIM MENSCHEN	10
1.5	FRAGESTELLUNGEN	22
2.	MATERIAL	25
2.1	VERSUCHSTIERE	25
2.2	CHEMIKALIEN	25
2.3	INJEKTIONSLSÖSUNGEN	27
2.4	LÖSUNGEN FÜR KONTAKTSENSIBILISIERUNG	28
2.5	LABOR- UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	28
2.6	GERÄTE	29
3.	METHODEN	29
3.1	PRIMÄRANTWORTEN DES POPLITEALEN LYMPHKNOTEN-TESTS (PLK-TEST)	29
3.2	SEKUNDÄRANTWORTEN DES PLK-TESTES	30
3.3	ADOPTIV-TRANSFER-PLK-TEST	30
3.4	KONTAKTSENSIBILISIERUNG MIT ALK-TEST	32
3.5	STATISTIK	32
4.	ERGEBNISSE	33
4.1	PRIMÄRANTWORTEN DES PLK-TESTES MIT $K_2[PdCl_4]$, $(NH_4)_2[PdCl_6]$, $PdCl_2$, Na_2PdCl_4 UND Na_2PdCl_6	33
4.2	SEKUNDÄRANTWORT DES PLK-TESTES MIT $(NH_4)_2[PdCl_6]$	36
4.3	NACHWEIS EINER „Pd“-SPEZIFISCHEN SENSIBILISIERUNG IM ADOPTIVEN-TRANSFER-PLK-TEST	37
4.4	NACHWEIS DER INDUKTIONSPHASE EINER KONTAKTSENSIBILISIERUNG NACH TOPISCHER APPLIKATION VON $K_2[PdCl_4]$ IM AURIKULÄREN-LYMPHKNOTEN-TEST (ALK-TEST)	39
5.	DISKUSSION	42
5.1	ERGEBNISSE ZUR SENSIBILISIERUNG VON MÄUSEN GEGEN VERSCHIEDENE PALLADIUMVERBINDUNGEN IM PLK-TEST	44
5.2	ERGEBNISSE ZUR INDUKTION EINER KONTAKTALLERGISCHEN REAKTION IN MÄUSEN DURCH TOPISCHE APPLIKATION VON $K_2[PdCl_4]$ MIT DEM AURIKULÄREN-LYMPHKNOTEN-TEST	55
5.3	ZUSAMMENFASSUNG	61
6.	LITERATURVERZEICHNIS	62-73
7.	ABBILDUNGEN 4.1.1 – 4.4.2	74-86

1. Einleitung

1.1 *Palladium: Vorkommen, Eigenschaften und Verwendungsformen*

Palladium, welches 1803 von Wollaston entdeckt und nach dem Planetoiden Pallas benannt wurde, gehört zur Gruppe der Platinmetalle, deren weitere Vertreter Ruthenium (Ru), Rhodium (Rh), Osmium (Os), Iridium (Ir) und Platin (Pt) sind. Diese Platingruppenelemente zählen ihrerseits, neben Gold (Au) und Silber (Ag), zu den Edelmetallen [1, 3]. Edelmetalle haben ein positives Normalpotential und sind deshalb im elementaren Zustand sehr stabil [3]. Gemeinsame typische Eigenschaft der Platinmetalle ist ihre Neigung zur Komplexbildung und ihre katalytische Aktivität [2].

Man findet Palladium im Periodensystem der Elemente in der achten Nebengruppe und damit unter den Übergangsmetallen. Diese Übergangsmetalle haben vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, da sie sehr unterschiedliche Ansprüche bezüglich ihrer mechanischen und sonstigen physikalischen und chemischen Eigenschaften erfüllen. Unter den Übergangsmetallen findet man große chemische Ähnlichkeiten, sowohl innerhalb einer Gruppe, als auch in einer Periode. Besonders ausgeprägt sind diese Ähnlichkeiten zwischen den im Periodensystem benachbarten Elementen Fe/Co/Ni, Ru/Rh/Pd sowie Os/Ir/Pt [1].

Palladium ist das häufigste Platinmetall. Man findet es in der Erdkruste mit einem Anteil von 0,01 mg/kg und damit an 71. Stelle in der Reihenfolge des Vorkommens. Die Weltproduktion betrug im Jahr 1988 neunzig Tonnen. Die wichtigsten Palladium-Vorkommen findet man in Kanada/Sudbury und Mittelsibirien/Norilsk. Dort ist es in den Nickelmagnetkieslagern als Pd-haltiger Sperreylith (Pt, PdAs_2) und

Stibiopalladinit (Pd_3Sb , ca. 70 % Pd-Gehalt) in die Schwermetallsulfide eingelagert. Außerdem kommt es in fast allen Platinerzen und in manchen Goldseifen, z.T. gediegen, d.h. rein, vor.

In der Herstellung wird Palladium nach Abtrennung von den anderen Platinmetallen von Ammoniumhexachloropalladat (IV) in Dichlorodiaminpalladium (II) überführt, dieses zu PdO-haltigem Palladium-Schwamm calciniert, und anschließend durch Glühen in Wasserstoff-Atmosphäre gereinigt. Durch chemische Reduktion mit Hydrazin oder Natriumformiat erhält man pyrophores Palladium-Mohr. Zu einem erheblichen Anteil wird Palladium auch aus industriellen Abfällen und Altmaterial zurückgewonnen [3].

In seinen Verbindungen kann Palladium mit folgende Oxidationsstufen auftreten:

0,+2,+3- und +4. Am häufigsten tritt Palladium allerdings in 2-wertiger Form auf.

Die Oxidationsstufen 0 und +4 sind sehr selten. Palladium glänzt heller als Silber und ist etwas härter und zäher als Platin [3]. Es gilt als sehr korrosionsbeständig [5]. Besonders charakteristisch ist seine Fähigkeit zur Aufnahme von Wasserstoff unter Gitteraufweitung und Versprödung. Eine kolloidale Palladiumlösung löst das 3000fache Volumen Wasserstoff. Der so gelöste Wasserstoff ist besonders reaktionsfähig und entweicht zum größten Teil schon bei Erwärmung auf 40-50 °C. Aus diesem Grund ist Palladium Basis vieler Hydrierungskatalysatoren. Wie auch bezüglich anderer chemischer Eigenschaften zeigt sich hier die Ähnlichkeit mit Nickel [3, 5].

Verwendung findet Palladium in folgenden Bereichen:

1. als **Hydrierungskatalysator** in der petrochemischen (Veredelung von Mineralölfraktionen zu Heizöl und Benzin) und pharmazeutischen Industrie. Durch seine Verwendung in der pharmazeutischen und in der chemischen Industrie ist Palladium als Verunreinigung in Lebensmitteln, Medikamenten und anderen Produkten des täglichen Gebrauchs enthalten. So können beispielsweise Medikamente technisch bedingt bis zu 1 mg Pd/kg als Verunreinigung enthalten [2].

2. In **Autoabgaskatalysatoren**, die vor allem im Ausland genutzt werden, kann Palladium zusammen mit anderen Platinmetallen enthalten sein. Im Jahre 1990 wurden weltweit etwa neun Prozent der Palladiumproduktion in Autoabgaskatalysatoren eingesetzt [4]. In der Bundesrepublik Deutschland wird derzeit kein Palladium in den Drei-Wege-Katalysatoren zugesetzt. Aus Kostengründen scheint es jedoch lukrativ, Platin durch Palladium in diesen Katalysatoren zu ersetzen, was in den USA Gegenstand der Forschung ist [6]. Dies würde zu steigenden Palladiumemissionen in die Umwelt führen.

3. Ein Großteil der **Dentallegierungen** im Zahnersatz besteht in Anteilen aus Palladium. Etwa 29 % des Weltjahresbedarfs an Palladium wird hier eingesetzt [7, 8]. B. Kütting und R. Brehler stellten fest, dass seit 1986 zunehmend Palladium aus Kostengründen in Dentallegierungen als Goldersatzstoff eingesetzt wird. In Verzeichnissen der Dentallegierungshersteller Degussa und Heraeus fanden sie insgesamt 87 Legierungen aufgeführt, von denen nur 8 palladiumfrei und 12 weniger als 2 % Palladium enthielten [9]. In einigen Palladiumbasislegierungen kann Palladium bis zu einem Anteil von 80 % enthalten sein [2]. Derzeit sind in Deutschland über 700 Dentallegierungen erhältlich, die vorwiegend zu Kronen verarbeitet werden [2a]. Aus diesen Legierungen läßt sich Palladium in geringen Anteilen (0,08 bis 0,48 ng pro cm² Oberfläche) durch synthetischen Speichel herauslösen [2].

4. Als **Kontaktmetall** in Telefonrelais und elektrischen Geräten [5].

5. In der **Schmuckindustrie** als Palladium-Silberlegierung oder Palladium-Goldlegierung. Weißgold ist eine Gold-Palladiumlegierung mit einem Goldanteil zwischen 33,3 und 80,0 % [3]. Eine Legierung aus Silber, Kupfer und Palladium wird für Schreibfedern verwendet [5]. In der Textilindustrie wird Palladium bei der Herstellung von Spinddüsen verwendet [3].

1.2 Palladium in der Geschichte der Medizin

Um die Jahrhundertwende wurde versucht, Palladium therapeutisch zu nutzen. So wurde versucht, es in der Therapie von Gicht, rheumatoider Arthritis, Tuberkulose, Übergewicht und als Hautdesinfektionsmittel einzusetzen [11, 12]. In einer Studie des National Research Council erwies sich PdCl_2 als Antituberkulostatikum als ungeeignet. Probeweise eingesetzt wurde es auch als Germazid. Bei Fettleibigkeit wurde es als Palladiumhydroxid eingesetzt. Hier zeigte es zwar Wirkung, allerdings traten an der Einstichstelle Nekrosen des Fettgewebes auf [13].

Seit den achtziger Jahren erregte Palladium als Antitumortheraeutikum und in der Transplantatabstoßung das Interesse der Medizin [10]. In der Antitumorthherapie ist es weiterhin Gegenstand der Forschung. So kommen T. RAU und R. VAN ELDIK zu dem Ergebnis, dass Palladium-II-Komplexe, analog den Anti-Tumor-Pt-II-Verbindungen, an Nukleotide der DNA binden, wobei eine Affinität zur N7-Position des Guanins wahrscheinlich ist [14]. Weitere Forschungsarbeiten werden klären müssen, ob Palladium-II-Komplexe eine klinische Relevanz haben.

1.3 Gesundheitliche Auswirkungen von Palladium im Tiermodell

1.3.1 Toxikologie von Palladium

Die meisten toxikologischen Untersuchungen an Tieren wurden mit Mäusen, Ratten und Kaninchen durchgeführt. Unter den akut toxischen Wirkungen des Palladiums findet man weitgehend von der Applikationsart unabhängige Schädigungen, die das Herz, die Nieren und die Leber betreffen. Daneben gibt es auch Angaben zu vom Aufnahmepfad abhängige Wirkungen, die jedoch nicht immer einheitlich sind [10]. Bei der Ermittlung von LD_{50} -Werten (tödliche Dosis für 50% der Tiere) ermittelte man einen Dosisunterschied je nach Applikationsmodus. So zeigt sich die größte Toleranz in Versuchen mit Ratten bei oraler Applikation ($\text{LD}_{50} = 200 \text{ mg/kg}$), bei intraperitonealer Applikation ist die

$LD_{50} = 70 \text{ mg/kg}$, bei intratrachealer Applikation $LD_{50} = 6 \text{ mg/kg}$ und am niedrigsten bei intravenöser Applikation mit $LD_{50} = 3 - 5 \text{ mg/kg}$ [15]. Die hier verabreichte Palladiumverbindung war $PdCl_2$. In Versuchen von HOLBROOK et al [16] wurden verschiedene Palladiumverbindungen getestet. Auch hier zeigten sich Unterschiede im toxikologischen Verhalten:

Versuchstiere	: Ratten	LD_{50} :
Applikationsroute	: Oral	
Verbindung	: $PdCl_2 \times H_2O$	$0,6 \text{ g / kg} = 2,7 \text{ mmol / kg}$
	$PdCl_2$	$1,6 \text{ g / kg} = 7,0 \text{ mmol / kg}$
	$PdSO_4$	$1,6 \text{ g / kg} = 7,0 \text{ mmol / kg}$
	PdO	$9,2 \text{ g / kg} = 40 \text{ mmol / kg}$

Dabei sind insgesamt einfache Salze zweiwertiger Palladiumionen dreimal toxischer als komplexe Palladiumsalze [17]. WIESTER beobachtete weiter, dass bei Ratten nach intravenöser Applikation von $0,25 - 2,0 \text{ mg/kg}$ zweiwertiger Palladiumsalze Herzrhythmusstörungen bis zum tödlichen Kammerflimmern auftraten [17]. Auch bei Kaninchen verursachte die intravenöse Gabe von 50 mg Palladiumchlorid / kg Körpergewicht den Tod durch Herzstillstand [18].

Auch auf zelluläre Ebene ließen sich toxische Schädigungen des Palladiums nachweisen. Nach intraperitonealer Applikation von jeweils 56 bzw. $113 \text{ } \mu\text{mol}$ $Pd(NO_3)_2$ pro kg Körpergewicht an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurden bei Ratten verminderte Enzymaktivitäten, sowie bei der höheren Dosis zusätzlich ein verminderter Gehalt der Mikrosomen an Cytochrom P450 und Cytochrom b_5 nachgewiesen [20].

Versuche von RAPAHA et al. legen es nahe, dass die Hemmung des von ihnen gemessenen Enzyms Prolyl-Hydroxylase (Kollagensynthese) auf einer kompetitiven Verdrängung des Fe^{2+} durch Pd^{2+} beruht [24].

In einem weiteren Bericht spekulieren SPIKES & HODGSON, dass die Hemmung der gemessenen extrazellulären Enzyme auf einer Bindung des Pd an Sulphahydril- oder Cystingruppen der Proteine beruht [25].

FISHER et al führten nach intraperitonealer Verabreichung von 3,2 mg/ kg $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ eine Messung der DNA-Synthese in verschiedenen Organen durch. Nach zwei Stunden war die DNA- Synthese in der Milz auf 35 %, in der Leber auf 40 % und in den Nieren auf 26% reduziert [21].

Eine mögliche Erklärung für die größere Toleranz bei Palladiumverbindungen, die auf oralem Wege verabreicht wurden, ermittelte MOORE et al. in weiteren Experimenten: Ratten, denen radioaktives Palladium ($^{103}\text{PdCl}_2$) oral verabreicht wurden, schieden dieses bereits nach drei Tagen zu 99% über die Fäzes aus. Dagegen wurde intravenös verabreichtes Palladium erst nach 40 Tagen zu 80% über Urin und Fäzes eliminiert, intratracheal verabreichtes Palladium nach 40 Tagen zu 95%. Palladium passierte in diesen Versuchen sogar die Plazenta und war in der Muttermilch nachweisbar [19].

Bei chronischer Exposition sind die toxikologischen Veränderungen ebenfalls weitgehend vom Aufnahmepfad unabhängig und in erster Linie in Leber und Nieren nachweisbar. So erkrankten zum Beispiel Mäuse, die lebenslang Palladiumchlorid mit dem Trinkwasser (5,0 mg/l) erhielten, etwa doppelt so häufig an benignen und malignen Tumoren, sowie einer Amyloidose von Leber, Nieren, Nebennieren, Milz und Herz, wie unbehandelte Kontrolltiere [22].

PHIELEPEIT et al. untersuchten den Verbleib von 50 mg/kg PdCl_2 nach einmaliger intraperitonealer Injektion in Mausleberzellen. Entgegen ihrer Erwartung fanden sich die höchsten Konzentrationen von Palladium nach 24 Stunden und nach fünf Tagen in den Nuklei und den Mitochondrien, weniger in den Mikrosomen und im Zytosol [23].

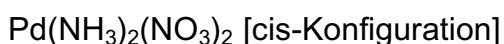
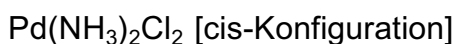
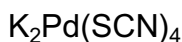
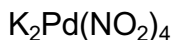
1.3.2 Sensibilisierende und allergenisierende Wirkungen

Tierexperimente zur allergenen Potenz von Palladiumverbindungen wurden bisher in geringer Anzahl vor allem mit Meerschweinchen und Katzen durchgeführt. TAUBLER veröffentlichte 1977 Ergebnisse aus Versuchen mit Meerschweinchen, denen er Palladiumovalbuminlösung intravenös und subkutan in verschiedenen Konzentrationen verabreichte. Die Meerschweinchen zeigten eine Sensibilisierung bzw. allergische Reaktion vom verzögerten Typ/ Typ IV-Reaktion. Dies war auch mit einer Palladium-Meerschweinchenalbuminlösung möglich [26].

TOMILETS et al. führten ähnliche Sensibilisierungsversuche mit Meerschweinchen durch, die eine Sofort (Typ I)- und eine Spätreaktion (Typ IV) für zwei Palladiumverbindungen ergaben, sowie eine allergische Sofortreaktion für ein Palladium-Ovalbumingemisch. Bei der Sofortreaktion der beiden Palladiumverbindungen war eine Kreuzreaktion mit Platin und Nickel feststellbar.

Für das Palladiumovalbumingemisch wurde zusätzlich eine Kreuzreaktion mit Kobalt beobachtet. Bei der allergischen Spätreaktion trat lediglich eine Kreuzreaktion mit Platin auf [27].

TOMILETS et al. führten weitere Versuche an Katzen durch. Sie verabreichten 30 Versuchstieren 0,313-12,5 mmol / Kg Körpergewicht folgender Palladiumkomplexe intravenös: PDX*Cl



- = 5-sulpho-8-mercaptoquinolate.

Sie führten Messungen von Kreislaufparametern durch, und stellten fest, dass nach vorübergehender Hämatokrit (Hkt)-zunahme, dann der Hkt abfiel, das zirkulierende Blutvolumen abnahm, der Blutrückstrom zum Herzen abnahm, der Blutdruck abfiel und ein Bronchospasmus einsetzte. Die Autoren werteten dies als eindeutig anaphylaktische Reaktion. Die sensibilisierende Potenz von Palladiumkomplexen schätzten sie hoch ein.

Im gleichen Versuch applizierten sie intradermal 35 Meerschweinchen folgende Verbindungen :

Gruppe I : 2x 0,4 ml mit 0,05 % Ovalbumin + $K_2[PdCl_4]$ (1:100). (Carrier + Hapten)

Gruppe II : 65 mg $K_2[PdCl_4]$ als Einzeldosis. (nur Hapten)

Nach 21 Tagen wurden die Meerschweinchen restimuliert wie folgt:

a. 0,5 ml der 0,05 % Ovalbuminlösung (nur Carrier)

b. 0,5 ml der 0,05 % Ovalbuminlösung mit K_2PdCl_4 (Carrier und Hapten)

c. 0,5 ml 10^{-3} M K_2PdCl_4 (nur Hapten).

Es zeigte sich, dass dieser Sensibilisierungsprozeß unabhängig davon ist, ob ein Carrier benutzt wird oder nicht. Die sensibilisierende Potenz des Haptens (K_2PdCl_4) ohne Carrier war ausreichend. In der Restimulationsphase hingegen trat bei alleiniger Haptenexposition nicht das Vollbild eines Schocks auf sondern nur ein Anstieg der Mediatorspiegel (Histamin u.a.). In beiden Versuchen postulierten die Autoren eine Reaktion vom Soforttyp / Typ I-Reaktion [28].

Weitere Versuche an Meerschweinchen zeigten, dass eine 1,25 %-ige, wäßrige Palladiumchloridlösung sowohl auf die Haut (epidermal) als auch in die Haut (intradermal) appliziert, eine Sensibilisierung hervorrufen kann. Damit wird Palladium als sogenanntes Grad-III-Allergen eingestuft [29, 30, 31].

WAHLBERG & BOMAN zeigten mit dem guinea pig maximization test (GPMT), dass die sensibilisierende Potenz von Palladiumchlorid größer einzuschätzen ist, als die von Nickelsulfat. Um zu zeigen, dass es sich um eine echte Sensibilisierung mit Palladiumchlorid handelt, sensibilisierten sie zwei Gruppen von Meerschweinchen;

die eine mit Palladiumchlorid (PdCl_2) 2,5 % in Wasser, die andere mit Nickelsulfat (NiSO_4) 0,3 % in Saline. Bei der Restimulation mit gleichen Substanzen in fallenden Konzentrationen war festzustellen, dass zwar die palladiumsensibilisierten Tiere auch auf Nickelsulfat positiv reagierten, dass aber die nickelsensibilisierten Tiere nur mit Nickel zu restimulieren waren, nicht jedoch auf Palladiumchlorid reagierten. Eine Nickelkontamination der Proben wurde vorher durch Atom-Absorptions-Spektroskopie ausgeschlossen, so dass es sich hier sowohl um eine echte Sensibilisierung mit Palladiumchlorid, als auch um eine echte Kreuzreaktion handeln dürfte [32].

1.4 Gesundheitliche Auswirkungen von Palladium beim Menschen

1.4.1 Toxikologie

Über mögliche toxikologische Schäden durch Palladium bei Menschen gibt es nur wenig Informationen. Die schon erwähnten subkutanen Injektionen von Palladiumverbindungen führten zwar zur gewünschten Gewichtsreduktion, bei einer Dosis von zwei bis fünf mg kolloidalem Palladium traten jedoch Fieber und eine über zwei Jahre nachweisbare schwarz- blaue Verfärbung an der Injektionsstelle auf. Injektionen mit Palladoazetat waren sehr schmerzhaft. Palladiumhydroxid führte bei Applikation zu faustdicken Infiltrationen und zu Nekrosen der Haut. In vitro zerstörte es Erythrozyten bis zu einer Verdünnung von 1:25000. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Euphorisierung aller Patienten [33].

1.4.2 Sensibilisierende und allergenisierende Wirkung beim Menschen

Über Palladium als klinisch relevantes Kontaktallergen gab es bis 1984 nur drei isolierte Fallberichte.

SHEARD berichtete 1955 über eine Patientin mit Kontaktekzemen am rechten und linken Ringfinger und den benachbarten dritten und fünften Finger der linken Hand.

Es stellte sich heraus, dass die Patientin palladium- und platinhaltige Ringe getragen hatte. Im Patch-Test zeigte die Patientin positive Reaktionen auf Platin und auf die aufgelegten Ringe, von denen der Verlobungsring einen Palladiumanteil von 90 % hatte. Auf Palladiumsalze wurde die Patientin nicht getestet [34].

Der nächste Bericht stammt aus dem Jahre 1969 von MUNRO-ASHMAN. Er berichtet über einen Chemiker, der an Edelmetallen, so u.a. über Palladium, forschte. Er entwickelte ein Ekzem im Gesicht, an den Händen und den Armen. Wenn er der Arbeit fernblieb, waren auch die Ekzeme rückläufig. Es wurde ein Patch-Test mit allen von ihm benutzen Metallen durchgeführt. Er zeigte eine Positive Reaktion auf 0.1% und 1% Na_2PdCl_2 und NiSO_4 0.1% und 1%. Die Reinheit der Palladiumproben wurde untersucht und als nickel-frei deklariert. Der Patient vermied fortan den Kontakt mit den beiden Metallen und seine Haut blieb damit unauffällig [35].

VAN KETEL und NIEBBER berichteten 1981 über eine 19-jährige Patientin mit schmerzhafter Schwellung der rechten Backe, Schmerzen im gesamten Mund, generalisiertem Juckreiz und Schwindel. Diese Symptome traten erstmals sechs Monaten nach Implantation einer Metallbrücke im Molarbereich auf. Ein Patch-Test mit der ICDRG Standard Serie ergab positive Reaktionen auf NiSO_4 und CoCl_2 . Ein weiterer Patch-Test mit den Metallen, die in der Brücke enthalten waren, ergab eine stark positive Reaktion auf PdCl_2 2% aq. Alle anderen Metallproben, so auch Platinchlorid, waren negativ. Es stellte sich heraus, dass die Brücke einen Palladiumanteil von 5% hatte. Nach Austausch dieser Brücke gegen eine metallfreie Dentalprothese verschwanden die Symptome innerhalb von wenigen Tagen [36].

In den achtziger Jahren wurden die Veröffentlichungen über Fallberichte und klinische Studien zahlreicher. Dabei handelte es sich immer (mit einer Ausnahme: MURDOCH & PEPYS,1987,[46]) um allergische Reaktionen vom verspäteten Typ / Typ IV nach Coombs und Gell. Einen Überblick über die folgenden Fallberichte gibt die Tabelle 1 :

Autoren	Fallzahl und Geschlecht	Patch-Test Konz. und Trägermedien von PdCl ₂	zusätzliche Reaktionen auf andere Metallsalze im Patch-Test	Patch-Test Ablesung nach [h]	Exposition gegenüber Palladium	Symptome und Befunde
SHEARD (1955) [34]	1 Frau	Ring mit 90 % Pd u. 10% Ru	Ring mit 90%Pt +10%Ir	48 h Reaktion positiv bis 5. Tag	Schmuck (Ringe)	Kontakt-dermatitis re. u. li. Ringfinger, sowie 3. +5. Finger links
MUNRO-ASHMAN et al. (1969) [35]	1 Mann	1% pet.	NiSO ₄	[keine Angaben]	Arbeitsplatz/Chemiker	Dermatitis der Hände u. Arme und des Gesichts
VAN KETEL & NIEBBER (1981) [36]	1 Frau	2% aq.	NiSO ₄ CoCl ₂	[keine Angaben]	Zahnbrücke mit 5%Palladiumanteil	schmerzhafte Schwellung der re. Backe, Schmerzen im Mund, gen. Juckreiz u. Schwindel
CASTELAIN & CASTELAIN (1987) [37]	1 Frau	1 % pet.	Keine	[keine Angaben]	Zahnprothese	Schwellung re. Winkel der Unterlippe
L. GUERRA et al. (1988) [38]	1 Mann	1 % pet.	NiSO ₄ 5%	48 +72 h	Hobby: Schußwaffen	erythematös, vesikuläre L. an Vorderarmen
[38]	1 Mann	1 % pet.	NiSO ₄ 5%	48+72 h	Hobby: Gewichtheben	erythematös, vesikuläre L. an Nacken, Vorderarmen u. Beinen
DOWNEY D. (1989) [39]	1 Frau	1 % aq.	nicht durchgeführt	[keine Angaben]	mehrere Zahnkronen; Palladiumgehalt 79%	erosiver oraler Lichen planus
[39]	1 Person	1 % aq.	nicht durchgeführt	[keine Angaben]	Zahnkrone	schmerzhafter Lichen planus
[39]	1 Person	1 % aq.	nicht durchgeführt	[keine Angaben]	Zahnersatz	Verdacht auf Kontaktmukositis
CAMARASA et al. (1989) [47]	7 Frauen	1 % pet.	NiSO ₄ 5% in pet.(7/7) CoCl ₂ 1% in pet.(3/7) Hg-Metall (1/7)	- 96 h	alle Metallschmuckallergie, keine Dentalprot.	Schweres chron. Handekzem
VAN JOOST et al. (1990) [40]	1 Frau	2,5 % aq.	Ni	48 +72 h	Zahnbrücke hoher Gehalt an Pd u. Ni	Schwellung der Unterlippe und disseminierte Urtikaria

Autoren	Fallzahl und Geschlecht	Patch-Test Konz. und Trägermedien von PdCl ₂	zusätzliche Reaktionen auf andere Metallsalze im Patch-Test	Patch-Test Ablesung nach [h]	Exposition gegenüber Palladium	Symptome und Befunde
HACKEL et al. (1991) [41]	1 Frau	1 % PdSO ₄ pet.	Zinnchlorid 2 % pet.	- 72 h	Zahnprothese	Juckreiz, Kitzeln und Trockenheit im Mund
[41]	1 Frau	1 % PdSO ₄ pet.	NiSO ₄ 5% pet. + Cu SO ₄ 1% pet.	- 72 h	Ni-Allergie in Vorgeschichte;	keine
[41]	1 Mann	1% pet.	CoCl ₂ 1%pet. + CoSO ₄ 2,5 % pet.	- 72 h	Metallarbeiter	Dermatitis der Hände
KÜTTING et al. (1994) [42]	1 Frau	0.1,0.5 + 1 % in Vaseline	keine	-96 h; positive Reaktionen erst nach 72 h	Dentalprothese mit 2 % Palladiumanteil	Trockenheit, Brennen und Rötung des Mundes; ständiger Hustenreiz
KOCH et al. (1996) [43]	1 Frau	1 % pet.	(Pt [NH ₄) ₂ Cl ₄) 0,25 % pet. + Pd-Metallplättchen + Pt- Metallplättchen	- 72 h + 10.d + 17.d + 31.d	Atopie, Zahnersatz	bullöse, ulzerative u. superinfizierte Läsionen mit Schwellung und Schmerzen der Mukosa

Demgegenüber stehen klinische Studien, mit denen Sensibilisierungsraten im Patch-Test ermittelt wurden. Der Umfang der Studien, sowie das ausgewählte Patientenkollektiv variieren stark und sind deshalb gelegentlich bei der Beurteilung ihrer Aussagekraft schwer einzuschätzen. Ebenso sind die Angaben zu Sensibilisierungsraten, meist auf PdCl₂, recht unterschiedlich, und variieren zwischen 0,6 % [46] und 43 % [56].

Zieht man nur Studien mit einem Stichprobenumfang von $n = 100$ in Betracht, um einen Stichprobenumfang zu haben, der statistische Aussagen erlaubt, verhalten sich die Sensibilisierungsraten wie folgt [46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 60, 62, 63, 64]:

Die geringste Sensibilisierungsrate auf PdCl₂ bei einem Stichprobenumfang von $n = 536$ [51] bzw. $n = 1307$ [52] liegt bei 2,4%. Die höchste Sensibilisierungsrate bei $n = 100$ ist mit 10 % ermittelt. Bemerkenswert ist der Anstieg der Sensibilisierungsraten, wenn das Klientel der Stichprobe aus Nickel-Allergikern zusammengesetzt wird. Bei einem Stichprobenumfang von $n = 411$ [58] ergab die Untersuchung eine Sensibilisierungsrate von 21.1%, bei einer weiteren Studie mit $n = 462$ lag sie sogar bei 33,6%.

KANERVA et al. [64] führten die einzige Studie mit einer Untersuchungsgruppe aus der Normalbevölkerung durch, d. h. es lag kein dermatologisches Klientel vor. Trotzdem ergab die Untersuchung interessanterweise eine Sensibilisierungsrate von 7%.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt Tabelle 2:

Autoren	Erscheinungs- jahr	Probanden- anzahl	Beschreibung	Sensibilisier- ungsrate	Andere Ergebnisse
VAN LOON et al. [44]	1984	n= 17 ausgewählt durch allergische Vorgeschichte	Patch-Test mit PdCl ₂ 2,5 % aq. + metallische Pd-Folie auf Mundschleim- haut	PdCl ₂ : 3/17 = 17,6% metallisches Pd = 0	Reaktionen auf Pd nicht isoliert; Probanden positiv auf Ni oder Ni + Co
VAN LOON et al. [45]	1986	n= 63 a:Kontakt- stomatitis=30 b:Kontakt- dermatitis =16 c:Kontrolle=17	Patch-Test mit PdCl ₂ 2,5 % aq.	7/63 = 11 % a: 1/30 b: 5/16 c: 1/17	bei Kontakt- dermatitis in Vor- geschichte häufiger positiv Patch-Test Reaktionen als Kontakt- stomatitis
MURDOCH & PEPYS [46]	1987	n= 306 Platin- Raffinerie- arbeiter	Prick-Test mit Pd (keine genaueren Angaben)	2/306 = 0,6%	Pd- Reaktion nicht isoliert; positiv auf (NH ₄) ₂ [PtCl ₆], Rh und Ru. Im Pt-(23/39) und Pd-(2/39) RAST vergleichbare Ergebnisse
AUGTHUN et al. [48]	1990	n = 486 Patienten der Hautklinik der RWTH Aachen	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% in Vaseline	36/486 = 7,4%	34/36 = NiSO ₄ pos.; nur 1 Proband solitäre Pd- Allergie; Testung mit Pd- Plättchen und Pd-Basis- legierung nur 1 Proband pos. Reaktion
REBANDEL & RUDZKI [49]	1990	n = 100 Dermatitis- patienten	Patch-Test mit PdCl ₂ 1 % aq. + 0,001-1% [Pd(NH ₃) ₄] (NO ₃) ₂) aq.	10/100 = 10% auf beide Pd- Lösungen bei 1%	alle 10 auch Ni- positiv.; keine solitäre Pd-Allergie

Autoren	Erscheinungs- jahr	Probanden- anzahl	Beschreibung	Sensibilisier- ungsrate	Andere Ergebnisse
CAMARASA et al. [50]	1991	n = 1521 Hautkliniks- patienten mit chron. Kontakt- dermatitis der Hände oder Ohr läppchen	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet.	42/1521 = 2,8%	39/42 auch Ni-positiv; diese 39 sind alle Frauen; nur 3 solitäre Pd-Allergien
TODD & BURROWS [51]	1992	n = 536 Kontakt- dermatitis	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet. & metallischer Palladium- Folie	13/536 = 2,4%	alle 13 auch NiSO ₄ 5% positiv; keine Reaktion auf metall. Pd
DE FINE OLIVARIUS & MENNÉ [52]	1992	n = 1307 Hautkliniks- patienten	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet.	32/1307 = 2,4%	29/32 auch NiSO ₄ pos.; 3 solitäre Pd-Allergien; 19/32 mit metall. Pd getestet; alle negativ
SCHWICK- ERATH & MERK [53]	1993	n = 637	Epikutan- testung von Ronden aus versch. Gold- legierungen mit Pd-Anteil und Pd- Legierungen	17/637 = 2,7%	4/17 pos. auf NiSO ₄
ABERER et al. [54]	1993	n = 1382 Ekzem- patienten	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet.	115/1382 = 8,3%	8/115 nur Pd-positiv; 107/115 auch Ni-pos.
VILAPLANA et al. [55]	1994	n = 66 Anwärter auf Dentalproth.	Patch-Test mit PdCl ₂ 1,5% pet.	4/66 = 6,1%	21/66 Ni-positiv
RUDZKI & PRYSTUPA [56]	1994	n = 30 Nickel-pos. Patienten	Patch-Test mit PdCl ₂ 1%	13/30 = 43%	43% = v.a. Patienten, die im Ni-Patch-Test auf niedrige Konzentrationen positiv waren.

Autoren	Erscheinungs- jahr	Probanden- anzahl	Beschreibung	Sensibilisier- ungsrate	Andere Ergebnisse
CINCENZI et al. [57]	1995	n = 2300 P. mit allerg. Kontakt- dermatitis	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet.	171/2300 = 7,4%	156/171 = Frauen; 169/171 = NiSO ₄ pos.; 50/171 = Ni+Cr+Co- positiv; in keinem Fall Ergebnis relevant für Klinik
SANTUCCI et al. [58]	1995	n = 411 NiSO ₄ 5% pet.-positive Patienten	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet. [+ PdCl ₂ aq. (40 µl/200µg PdCl ₂) +metall. Pd]	87/411 = 21,1%	auf PdCl ₂ aq. nur 3 P. positiv; auf metall. Pd keine positive Reaktion
KOCH & BAHMER [59]	1995	n = 11 Patienten mit oral- lichenoiden Läsionen; bei 10/11 Bezug zur Dental- legierung	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet.	4/11 = 36,4%	1 Biopsie des Patch-Tests: granulomatöse Reaktion; 1 Biopsie: Lichenoide Reaktion
UTER et al. [60]	1995	n = 462 Nickel- allergiker	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet.	104/309 = 33,6%	Pd-metall.: 1 fragliche Reaktion; schwere Ni- Allergiker reagierten 4 x häufiger auch auf Pd als Ni- Allergiker, die nur auf hohe Konz. von Ni pos. reagierten
SCHÜRER et al. [61]	1995	n = 30 P. mit oralen Problemen bei Dental- prothese	Patch-Test mit PdCl ₂ 1%	6/30 = 20%	Testung wurde an Innenseite der Oberarme durchgeführt

Autoren	Erscheinungs- jahr	Probanden- anzahl	Beschreibung	Sensibilisier- ungsrate	Andere Ergebnisse
MARCUSSON [62]	1996	n = 397 P. mit generalisierten Beschwerden, die mit Dental- legierung in Verbindung gebracht werden	Patch-Test mit PdCl ₂ 1% pet	30/397 = 8%	2 solitäre Pd- Allergien; simultane Allergie: Au: 11/30 Ni: 7/30 Ni+Au: 10/30
KRÄNKE & ABERER [63]	1996	n = 11516 Ekzem- patienten aus 14 Zentren	Patch-Test mit PdCl ₂	8%	NiSO ₄ :23%, statistisch assoziiert: Ni-Pd: 33% Pd-Ni: 94,6%
KANERVA et al. [64]	1996	n = 700 Normalbe- völkerung; kein dermatolog. Klientel	Patch-Test mit PdCl ₂ 2% pet.	48/700 = 7 %	Frauen: 44/417= 11% Männer: 4/283= 1% Pd-positiv; 3 solitäre Pd-Allergien, 45 komb. mit NiSO ₄ 5% pet.

Wie in den Fallbeispielen und den Studien beschrieben, handelt es sich hier fast ausschließlich um allergische Reaktionen vom verzögerten Typ/Typ IV-Reaktionen.

MUROCH & PEPYS [46] gelang es, bei zwei von 306 Platinraffeneriearbeitern im Prick-Test eine positive Reaktion auf Palladium (Sensibilisierungsrate = 0.6%) zu erhalten. Dies ist der einzige Bericht einer Typ I-Reaktion beim Menschen.

In Tierversuchen mit Meerschweinchen und Katzen gelang es TOMILETS [28] eine allergische Reaktion vom Soforttyp zu demonstrieren.

Von einigen Autoren wird die Wichtigkeit eines späten Ablesezeitpunktes betont.

MARCUSSON [62] stellte fest, dass bei der Patch-Testablesung am dritten Tag der Befund häufig negativ war, dagegen am vierten Tag, insbesondere bei Palladium, stark positiv. KOCH & BAHMER [59] führten Ablesungen am Tag 10 und 17 durch und diese waren häufig über diesen Zeitpunkt hinaus noch positiv. In einem Fall trat die positive Reaktion nur am Tag 17 auf. Auch bei KÜTTING et al. [43] trat die positive Reaktion erstmals nach 72 h auf. Eine entsprechend späte Ablesung scheint also von Nöten zu sein.

Die meisten Berichte beschreiben bei relevanter Klinik meist eine Kontaktdermatitis [34, 35, 38, 47, 41].

Seltener wird von einer Kontaktmukositis, ausgelöst durch Dentalprothesen, berichtet [42, 36, 37, 40, 43].

Eine Besonderheit stellt die Klassifikation als oraler Lichen planus dar. Dies wurde dreimal in der Literatur berichtet. DOWNEY [39] beschrieb zwei Fälle mit oral erosiven Lichen planus, die beide im Patch-Test auf PdCl_2 1% positiv waren. Ein weiterer wurde von NAKAYAMA et al.[65] beschrieben. KOCH & BAHMER [59] beschrieben eine Patch-Testreihe mit PdCl_2 1% per bei oralem Lichen planus, der mit Dentallegierungen in Verbindung gebracht wurde. In 4/11 Fällen wurde eine Sensibilisierung nachgewiesen. In acht Fällen wurde in der Histologie ein oraler Lichen planus diagnostiziert, der außer bei einem Pd-sensibilisierten Patienten auch bei Amalgam- und Gold-sensibilisierten Patienten auftrat.

MARCUSSON [62] beschränkte seine Untersuchungen nicht nur auf die dermalen Beschwerden, sondern erfragte bei seinen Probanden Symptome, die andere Organsysteme betrafen, die sie aber mit der Metallallergie ätiologisch in Verbindung brachten. Von 397 untersuchten Patienten mit Dentallegierungen befragte er 101 nach generalisierteren, vorwiegend subjektiven Symptomen. Interessanterweise wurden orale Symptome in 20-40% der Fälle geklagt, demgegenüber aber beschrieben 62% der Probanden ausgeprägte Müdigkeit und Erschöpfung, 52% klagten über Schmerzen im Muskeln und Gelenken, die einen zeitlichem Zusammenhang mit dem Einsatz von Dentalprothesen hatten. Auffällig in dieser Studie, wie auch in vielen anderen, ist der hohe Anteil von Frauen. Ein häufiges Erklärungsmodell ist hier das Tragen von Modeschmuck, insbesondere Ohrringen, welches zu einer Exposition gegenüber Nickel und anderen Edelmetallen führt und somit möglicherweise zu einer Sensibilisierung.

Mit dem RAST (Radio-allergo-sorbent-test) als in-vitro-System wurde versucht, gegen Palladium spezifisches IgE nachzuweisen. Dies gelang MURDOCH & PEPYS [46] in einer Gruppe von 39 Platinraffineriearbeitern, die im Prick-Test auf Platin positiv reagierten. Von diesen 39 Personen reagierten im RAST zwei positiv auf Palladium. Diese zwei Probanden waren auch im Prick-Test auf Palladium positiv. Dies ist der einzige Bericht, in dem es einen Hinweis auf eine Typ I-Reaktion beim Menschen gibt. In den meisten Arbeiten wird eine Typ IV-Reaktion beschrieben, so dass der Wert dieses Ergebnisses unklar bleibt.

Mit der intrakutanen Injektion von Serum sensibilisierter Patienten in Primaten (Passive kutane Anaphylaxie/ PCA-Test) versuchte BIAGINI et al. mittels der zirkulierenden Pt-spezifischen IgE-Antikörper eine mögliche Kreuzreaktion mit Palladium nachzuweisen. In zwei Fällen gelang es, diese positive Reaktion von Pd auf Pt-spezifisches IgE zu zeigen. Ein Serum lieferte sogar nur auf Pd eine positive Reaktion im PCA-Test, und war negativ auf entsprechende Pt-Verbindungen [66]. Dieses Gesamtergebnis war überraschend, da es anderen Untersuchern widerspricht. Letztlich kann es die Frage nach einer möglichen Kreuzreaktion nicht beantworten.

Durch den zunehmenden Gebrauch von Palladium, insbesondere bei einem möglichen Einsatz in Autoabgaskatalysatoren als Ersatz für Platin, ist ein gesundheitliches Risiko durch Palladium nicht auszuschließen. Derzeit betonen einige Untersucher, dass selbst hohe Sensibilisierungsraten auf Palladium klinisch keine Relevanz haben, da die Klinik einer solchen Palladiumsensibilisierung weitaus seltener auftritt als sie in Patch-Testen nachgewiesen wird. Ob deshalb der Einsatz von Palladium unbedenklich, und beachtliche Sensibilisierungsraten zu vernachlässigen sind, läßt sich derzeit nicht beantworten.

Ziel dieser Arbeit war es, erstmals die allergene Potenz verschiedener Palladiumverbindungen im Tierexperiment zu ermitteln. Dies sollte über verschiedene Applikationsrouten untersucht werden.

1.5 Fragestellungen

1.5.1 Induzieren Palladiumkomplexverbindungen T-Zell- und dosisabhängige

Primärantworten im Poplitealen Lymphknoten-Test (PLK-Test)?

Der PLK-Test, ursprünglich entwickelt zur Quantifizierung lokaler Graft-versus-Host (GvH)-Reaktionen, entwickelte sich in zahlreichen Untersuchungen als einfaches und prädiktives Testsystem zur Analyse des T-Zell-sensibilisierenden Potentials niedermolekularer Chemikalien [67, 68, 69, 70, 71, 72, 73]. SCHUPPE [74] untersuchte Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$ in verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen. In Mäusen des Stammes C57BL/6 untersuchte er die Kinetik einer solchen Primärantwort. Die T-Zell-Abhängigkeit dieses Testes wurde durch den Vergleich phänotypisch normaler (NMRI +/-nu) mit athymischen, T-Zell-defizienten Mäusen nachgewiesen.

Die zu testenden Substanzen $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$, $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$, PdCl_2 , Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 wurden in aufsteigenden Konzentrationen überwiegend in Mäuse des Stammes BALB/c

subkutan in die Fußsohle, injiziert. Ihre T-Zell-Abhängigkeit im PLK-Test und eine Dosis-Wirkungs-Beziehung sollten somit demonstriert werden.

1.5.2 Lassen sich mit Palladiumverbindungen direkt Zweitantworten auslösen?

Nach vorausgegangener Sensibilisierung im PLK-Test kann mit einer zweiten niedrigeren, subimmunogenen Dosis (d.h. eine Konzentration, die im PLK-Test zu gering ist, um eine positive Reaktion auszulösen) eine Zweitantwort provoziert werden. Dieser mögliche Index (Zellzahl behandelte Seite/ Zellzahl unbeh. Seite) gibt Hinweise auf ein zumindest lokales immunologisches Gedächtnis (T-Zell-Abhängigkeit) bezüglich der getesteten Substanz.

Um so einen mitogen-ähnlichen Effekt auszuschließen und die T-Zell-Abhängigkeit zu demonstrieren, sollte in BALB/c-Mäusen nach abgeklungener Primärantwort durch subkutane Injektion einer subimmunogenen Dosis von Palladium in die Fußsohle eine Zweitantwort ausgelöst werden. Für $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$ zeigte LERCHENMÜLLER [75] im PLK-Test eine Zweitantwort.

1.5.3 Lassen sich nach chronischer Belastung mit $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ und $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ über die nasale Route im Adoptiven Transfer systemische, T-Zell-abhängige Reaktionen nachweisen?

Beim Adoptiv-Transfer-PLK-Test handelt es sich um eine Erweiterung des PLK-Testes, mit dem sich die Induktion einer systemischen, zellulären und persistierenden Immunantwort nach chronischer Exposition gegenüber niedermolekularen Chemikalien nachweisen läßt.

Die durch chronische Exposition induzierte systemische, T-Zell-abhängige Sensibilisierung läßt sich durch Transfer immunkompetenter T_H -Zellen in nicht sensibilisierte syngene Empfänger übertragen. Durch Injektion subimmunogener Dosen von Palladium in die Empfänger dieser immunkompetenten Zellen, läßt sich eine positive Zweitantwort im PLK-Test nachweisen. Dies wurde von

LERCHENMÜLLER [75] für Platin und von anderen Autoren für Streptozotcin [69] und eine Goldverbindung [73] demonstriert.

1.5.4 Lässt sich auch durch topische Applikationsweise von $K_2[PdCl_4]$ eine T-Zell-abhängige Sensibilisierung auslösen und welche histologischen Veränderungen hat dies zur Folge?

KIMBER demonstrierte, dass der aurikuläre Lymphknoten-Test (ALK-Test) ein prädiktives Testsystem zur Erfassung und Quantifizierung der Induktionsphase kontaktallergischer Reaktionen ist [76, 77].

In dieser Arbeit wurde durch topische Applikation der Palladiumverbindung auf die Außenseite beider Ohren eine Sensibilisierung ausgelöst. Durch Ermittlung, der durch Palladium induzierten Zellproliferation in den aurikulären Lymphknoten, die als Quotient aus den Zellzahlen der aurikulären Lymphknoten der Test- und der Kontrollgruppe gebildet wird, lässt sich die Reaktion quantitativ erfassen.

Von LERCHENMÜLLER [75] wurde für $Na_2[PtCl_6]$ ein ALK-Index von 3,9 ermittelt.

Die histologischen Proben sollen klären, welche morphologischen Veränderungen die topische Applikation auslöst und ob Analogien zu histologischen Veränderungen bestehen, die durch das potente Allergen Oxazolon ausgelöst werden.

2. Material

2.1 Versuchstiere

In den Tierversuchen wurden folgende Maus-Inzuchtstämme verwendet:

BALB/c, Weibchen, MHC-Klasse-II-Haplotyp H-2^d, gezüchtet in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

C57BL/6, Weibchen, MHC-Klasse-II-Haplotyp H-2^b, erhalten von Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover.

NMRI-Mäuse (+/nu) und NMRI-Mäuse (nu/nu), Weibchen, Auszuchtstamm, gezüchtet in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf .

Falls keine anderen Angaben gemacht werden, waren die Versuchstiere zu Beginn der Versuche 8-12 Wochen alt. Sie erhielten eine Standard-Nahrung sowie Wasser ad libitum.

2.2 Chemikalien

1. Kaliumtetrachloropalladat (II), $K_2[PdCl_4]$, MG 326,42, Johnson Matthey, Karlsruhe.
2. Ammoniumhexachloropalladat (IV), $(NH_4)_2[PdCl_6]$, Johnson Matthey, Karlsruhe.
3. Palladiumchlorid (II), $PdCl_2$, MG 177,6; Degussa AG, Hanau.
4. Natriumtetrachloropalladat (II), $Na_2PdCl_4 \times 3 H_2O$, MG 348, Degussa AG, Hanau.
5. Natriumhexachloropalladat (IV), Na_2PdCl_6 , MG 365, Degussa AG, Hanau.

2.2.2 Weitere Substanzen

1. 4-Ethoxy-methyl-2-phenyl-oxazol-5-one / Oxazon, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.
2. Formaldehyd 4%, Apotheke der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
3. Azeton, Apotheke der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
4. Tryptan-Blau, Flow Laboratories, VG, USA.
5. physiologische Kochsalzlösung, B. Braun, Melsungen.
6. DMSO, Dimethylsulfoxid z.A., getrocknet, E. Merck, Darmstadt.
7. DAE im Verhältnis 4:3:3; D: Dimethylacetamid, Sigma Chemical Co., USA.
 A: Azeton, Apotheke HHU-Düsseldorf.
 E: Ethanol, Apotheke HHU-Düsseldorf.
8. DMF; N,N-Dimethylformamid, C_3H_7NO , Merck-Schuchardt, Hohenbrunn.
9. Kaliumtetraplatinat, K_2PtCl_4 , Degussa AG, Hanau.
10. Tris-HCl, Merck Darmstadt.

2.2.3 Puffer

- A. Erythrozyten-Lyse-Puffer:
 Tris-Lösung: 2.06 g Tris-hydroxy-methyl-amino-methan in 90 ml H_2O (dest.) lösen, dann mit 1N HCl auf pH = 7,5 einstellen ad 100 ml.
 0,83 g Ammoniumchlorid in 90 ml H_2O (dest.) lösen, dann mit Tris-Lösung auf pH = 7,3 einstellen.
- B. „Hank 's buffered salt solution“ (HBSS):
 Folgende Substanzen (E. Merck, Darmstadt) werden in 1 ltr. H_2O dest. gelöst:
 8 g NaCl; 0,2 g $CaCl_2 \times H_2O$; 0,2 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$; 0,4 g KCl; 0,1 g KH_2PO_4 ;
 1,27g $NaHCO_3$; 2g Glukose/ $C_6H_{12}O_6$.
- C. „Phosphate buffered saline“ (PBS):
 Folgende Substanzen (E. Merck, Darmstadt) werden in 1 ltr. H_2O (dest.) gelöst: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,16 g Na_2HPO_4 ; 0,2 g KH_2PO_4 .

2.3 Injektionslösungen

Für die verschiedenen Testsysteme wurden Stammlösungen unterschiedlicher Verbindungen und Konzentration angesetzt:

A. Primärantwort des PLK-Testes:

Die Stammlösung für $K_2[PdCl_4]$, $(NH_4)_2[PdCl_6]$, Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 wurden mit 10 mg/ml NaCl angesetzt, und mit 0,9% NaCl zu den verschiedenen Testkonzentrationen verdünnt (siehe 3.1).

Für $PdCl_2$ wurde die Stammlösung mit 5 mg/ml NaCl angesetzt und mit 0.9% NaCl zu den verschiedenen Testkonzentrationen verdünnt (siehe 3.2)

Die Stammlösungen und die verschiedenen Testkonzentrationen wurden am Tag 0 der Experimente angesetzt und steril filtriert.

B. Sekundärantwort des PLK-Testes:

Ansetzen der Stammlösung von $(NH_4)_2[PdCl_6]$ mit 5 mg/ml alle vier Wochen. Ansetzen der Lösungen für Restimulation in 18. Woche des Experimentes. Stammlösung: $(NH_4)_2[PdCl_6]$ 5 mg/ml NaCl. Herstellen der verschiedenen Testkonzentrationen mit 0.9% NaCl (siehe 3.2);. Alle Injektionslösungen steril filtriert.

C. Adoptiv-Transfer-PLK-Test:

Zellspendertiere: Stammlösungen mit 10 mg/ml NaCl alle 4 Wochen neu angesetzt. Testkonzentration von $K_2[PdCl_4]$ mit 3,6 nmol/ 25µl bzw. 1,3 µg/ 25µl wurden wöchentlich neu angesetzt und steril filtriert.

Zellempfängertiere: Ansetzen der Stammlösung mit 5 mg/ml $((NH_4)_2[PdCl_6])$ bzw. 10 mg/ml $(K_2[PdCl_4])$ und Herstellung der Testkonzentrationen von 16,5 nmol, 12 nmol und 9 nmol/ 40µl durch Verdünnen der Stammlösung mit 0.9% NaCl am Tag 0 des Transfers der Milzzellen. Alle Injektionslösungen steril filtriert.

2.4 *Lösungen für Kontaktsensibilisierung*

Induktionsphase: Ansetzen der Lösungen von $K_2[PdCl_4]$ in den Konzentrationen 1% (10 mg/ml) bis 5% (50 mg/ml) und einer 1%-igen Oxazolone-Lösung am ersten Tag der Sensibilisierungsphase.

Restimulationsphase: Ansetzen einer 1%-igen Palladiumlösung und einer 0,1%-igen Oxazolone-Lösung am Tag der Restimulation.

Als Lösungsmittel wurde DAE (siehe 2.2.2) eingesetzt.

2.5 *Labor- und Verbrauchsmaterialien*

- Einmal-Pipetten: 5, 10 und 25 ml, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg.
- Einmal-Spritzen: 1 ml (Braun, Melsungen), 2, 5, 10 und 20 ml (Dahlhausen).
- Einmal-Kanülen: Typ Microlance, Nr. 20, Becton Dickinson, Dublin, Irland.
- Zentrifugenröhrchen: 10 ml, 50 ml, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg.
- Pipetten: Varipette 4710, einstellbar zwischen 0,5 und 1000 µl. Eppendorf, Hamburg.
- Steril-Filter: Millex-HA, 0,45 µm Filter Unit, Millipore, Molsheim, Frankreich.
- Sieb: Sigma Sieve Screen, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.
- Zählkammer: Neubauer-Zählkammer (Tiefe 100 µm, Fläche 0,0025 mm²), Brand.

2.6 Geräte

- Analysenwaage: Typ R160 P, Sartorius, Göttingen.
- Bestrahlungsgerät: Gammacell 2000, Molsgaard, Dänemark.
- Flow Modell BSB 3A, Gelaire, Opera, Italien.
- Hautfaltendickenmesser: ODI 00 TG, Kroeplin, Schlüchtern.
- Mikroskop: Modell Standard 14, Carl Zeiss, Oberkochen.
- Pipettierhilfe: Accuboy, Tecnomara, Zürich, Schweiz.
- Zellzählgerät: CASY-1, Schärfe System GmbH, Reutlingen.
- Zählhilfe: Modell H-20, Link.
- Zentrifuge Minifuge T, Heraeus, Düsseldorf.

3. Methoden

3.1 Primärantworten des Poplitealen Lymphknoten-Tests (PLK-Test)

Jeweils fünf bis sechs Mäuse unterschiedlicher Inzuchtstämme wurden in eine Gruppe zusammengefaßt. Die Injektionslösungen wurden wie unter 2.3 beschrieben hergestellt.

Für $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ wurden folgende Konzentrationen getestet: 9 nmol, 10 nmol, 12 nmol, 16,5 nmol, 18 nmol, 45 nmol, 90 nmol und 180 nmol, jeweils in 40 µl NaCl 0,9%.

Testkonzentrationen für $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$: 9 nmol, 18 nmol, 45 nmol, 90 nmol und 180 nmol, jeweils in 40 µl NaCl 0,9%.

Testkonzentrationen für PdCl_2 , Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 : 45 nmol, 90 nmol und 180 nmol, jeweils in 40 µl NaCl 0,9%. (Auf die Konzentrationen von 9 nmol und 18 nmol wurde verzichtet, da es sich analog zu den anderen Palladiumverbindungen um subimmunogene Dosen handelt).

Am Tag 0 des PLK-Testes wurden den Mäusen die Injektionslösung in die linke hintere Fußsohle s.c. injiziert. Die rechte Fußsohle blieb unbehandelt. Am Tag 6 des Experimentes wurden die Tiere unter Äthernarkose getötet und die poplitealen

Lymphknoten präpariert. Diese wurden seitengespalten in 500 µl PBS aufgenommen und homogenisiert. Die Zellzahl jedes Lymphknotens wurde in einer Neubauer-Zählkammer bzw. mit dem Zellzählgerät CASY-1 ermittelt. Der Index beider Lymphknoten eines Tieres wurde als Quotient der Zellzahlen der behandelten gegen die unbehandelte Seite ermittelt. Eine Reaktion wird als positiv gewertet, wenn der Index ≥ 2.0 ist. Mit 0,9% NaCl behandelte Tiere dienten als Kontrolle.

3.2 Sekundärantworten des PLK-Testes

Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c wurden eingesetzt. In jeder Gruppe wurden 5-6 Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden über 11 Wochen jeweils ein Mal pro Woche mit 3,6 nmol/ 25 µl (= 1,3 µg/ 25 µl) $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ bzw. NaCl 0,9% nasal behandelt. Es schloß sich ein sechswöchiges behandlungsfreies Intervall an. Die kumulative Dosis pro Tier betrug 39,6 nmol/ 14,3 µg. Am Tag 0 der Restimulationsphase wurde den Tieren eine suboptimale Dosis von 16,5 nmol / 40 µl $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ bzw. NaCl 0,9% s.c. in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die Tiere unter Äthernarkose getötet und die poplitealen Lymphknoten präpariert. Die Lymphknoten wurden seitengespalten in 500 µl PBS aufgenommen und homogenisiert. Die Zellzahlen beider Lymphknoten wurden ermittelt und dann daraus der Index gebildet (Zellzahl behandelte Seite/ unbeh.).

3.3 Adoptiv-Transfer-PLK-Test

3.3.1 Chronische Exposition der Spendertiere

Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c wurden über 11 Wochen wöchentlich mit 3,6 nmol / 25 µl $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ bzw. $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ oder NaCl 0,9% nasal behandelt. Die $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ -Gruppe hatte ein vierwöchiges behandlungsfreies Intervall, die $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ -Gruppe ein vierzehnwöchiges behandlungsfreies Intervall. Die Injektionslösungen wurden wie unter 2.3.3 beschrieben angefertigt.

3.3.2 Zellpräparation

Die langzeitbehandelten Tiere wurden unter Äthernarkose getötet. Ihre Milzen wurden mit sterilem Besteck präpariert, in 10 ml HBSS aufgenommen und auf Eis gekühlt.

Sie wurden in sterilen Sieben auf Petrischalen zerkleinert und mittels Spritzenstempeln homogenisiert. Die Siebe wurden mehrfach mit HBSS nachgespült, um eine gute Zellausbeute zu erhalten. Die Zellsuspension wurde in Blue-Max-Röhrchen aufgenommen und anschließend bei 1200 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 1 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer für 4 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von HBSS gestoppt. Nach zweimaligem Waschen und Zentrifugieren wurden die Zellen mit 30 Gy bestrahlt, was die Zellproliferation verhindert, nicht aber andere vitale Zellfunktionen beeinträchtigt, wie z. B. die Synthese und Sekretion von Zytokinen [78].

Anschließend wurden die Milzzellen auf ihre Vitalität untersucht, indem eine Färbung mit Tryptan-Blau (verdünnt 1:10) durchgeführt wurde. Die Anzahl der vitalen Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dann wurden die Milzzellen, falls nicht anders angegeben, auf 1×10^7 vitale Zellen/ 50 µl HBSS eingestellt.

3.3.3 Übertragung der palladiumsalz-sensibilisierten Milzzellen in syngene Empfänger

Nach Gewinnung und Einstellung der Milzzellen auf 1×10^7 pro 50 µl HBSS, wurden diese Zellen der palladium- und NaCl-behandelten Tiere, Gruppen von 5 -7 syngen, unbehandelten Empfängertieren in die linke Hinterpfote s.c. injiziert. Die rechte Hinterpfote blieb unbehandelt.

Am Tag 1 nach Transfer der Milzzellen in die Empfängertiere wurde diesen Tieren jeweils suboptimale Dosierungen (16,5 nmol) verschiedener Palladiumverbindungen bzw. NaCl als Kontrolle in die linke Hinterpfote s.c. injiziert.

An Tag 7 des Adoptiven-Tansfers wurden die Tiere unter Äthernarkose getötet, die poplitealen Lymphknoten präpariert und der PLK-Index ermittelt (siehe 3.1).

3.4 *Kontaktsensibilisierung mit ALK-Test*

Es wurden Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c verwendet. Sie wurden in Gruppen von 3 bis 5 Tieren eingeteilt. Falls nicht anders angegeben, wurde diesen Tieren auf die Außenseite ihrer Ohren von Tag 0 bis 3 jeweils 25 µl Palladiumlösungen von 1% bis 5% mittels Pipette gleichmäßig aufgetragen. Dies wurde ohne Äthernarkose durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden Azeton, DMSO, DAE und DMF getestet (siehe 2.2.2). Es stellte sich jedoch heraus, dass DAE das geeignetste Lösungsmittel ist. Die Kontrollgruppe wurde entsprechend nur mit dem Lösungsmittel behandelt. Es wurde eine Positiv-Kontrolle mit dem potenten Kontaktallergen Oxazolon 1% im Lösungsmittel mitgeführt. An Tag 5 des Experimentes wurden die Tiere unter Äthernarkose getötet, die aurikulären Lymphknoten präpariert und in PBS aufgenommen. Es wurden Einzelzell-Suspensionen durch mechanische Zerstörung des Gewebes hergestellt und die Zellzahlen mittels Zellzählgerät ermittelt. Aus der Zellzahl der Einzeltiere wurde die mittlere Zellzahl der Test- und der Kontrollgruppe ermittelt. Der Quotient der mittleren Zellzahl der Testgruppe durch die mittlere Zellzahl der Kontrollgruppe ergab den ALK-Index.

Gleichzeitig erfolgte die Entnahme beider Ohren für die histologische Untersuchung. Diese wurden in 4% Formaldehyd fixiert. Nach Entwässerung mit 70% Ethanol und Einbettung in Paraffin wurden Serienschnitte angefertigt und mit HE gefärbt.

3.5 *Statistik*

Aus den Einzeldaten der Experimente wurde zur statistischen Auswertung der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Zur Untersuchung der Signifikanz der Ergebnisse wurde der nicht parametrische Zwei-Stichproben-Test für unverbundene Stichproben nach Mann-Whitney-Wilcoxon durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Primärantworten des PLK-Testes mit $K_2[PdCl_4]$, $(NH_4)_2[PdCl_6]$, $PdCl_2$, Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6

Ziel dieser Arbeit war es im Mausmodell die sensibilisierende Potenz verschiedener Palladiumverbindungen nach einmaliger subkutaner Injektion zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere die Frage der Dosisabhängigkeit geklärt werden. Es wurden BALB/c und C57Bl6-Mäuse eingesetzt, weil diese sich als „Responder“ in Experimenten mit Pt-Komplexverbindungen erwiesen haben [74, 75]. Weiterhin wurden Experimente mit Mäusen des Stammes (NMRI nu/nu) und (NMRI +/-nu) durchgeführt. Der Vergleich phänotypisch normaler Mäuse (NMRI +/-nu) mit athymisch, T-Zell-defizienten Mäusen (NMRI nu/nu) demonstriert die T-Zell-Abhängigkeit der PLK-Antwort.

Die zu testenden Palladiumverbindung wurden in Dosen zwischen 9 nmol und 180 nmol verabreicht. Diese wurden subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Die Auswertung wurde, wie unter Punkt 3.1 beschrieben, durchgeführt. Die Applikation höherer Dosen wurde nicht durchgeführt, da LERCHENMÜLLER [75] in analogen Experimenten mit Platinverbindungen in höheren Konzentrationen eine deutliche Abnahme der PLK-Reaktion zeigen konnte, die als toxischer Effekt gedeutet wurden.

Für die getesteten Verbindungen $K_2[PdCl_4]$, $(NH_4)_2[PdCl_6]$, $PdCl_2$, Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 zeigte sich eine positive Korrelation zwischen PLK-Indizes und verabreichten Dosen. Die Ergebnisse der Experimente sind in den Abbildungen 4.1.1 bis 4.1.8 graphisch dargestellt.

Bei der Applikation von $K_2[PdCl_4]$ zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl 0,9% s.c. in die linke Hinterpfote) bei 9 nmol

(PLK-Index: 1,44), 18 nmol (PLK-Index: 1,8), 45 nmol (PLK-Index: 2,2), 90 nmol (PLK-Index: 4,79) und 180 nmol (PLK-Index: 7,1), →(Abb. 4.1.1).

Für **(NH₄)₂[PdCl₆]** zeigten sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe bei 18 nmol (PLK-Index: 2,92), 45 nmol (PLK-Index: 3,85), 90 nmol (PLK-Index: 4,32) und 180 nmol (PLK-Index: 6,8). Bei 9 nmol (PLK-Index: 1,88) war kein signifikanter Unterschied aufzuzeigen →(Abb. 4.1.2).

Für **PdCl₂** zeigten sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe bei 90 nmol (PLK-Index: 4,84) und 180 nmol (PLK-Index: 6,09). Bei 45 nmol (PLK-Index: 2,72) war kein signifikanter Unterschied darstellbar.

Dies führten wir auf die schwierige Löslichkeit von PdCl₂ zurück. In einem zweiten durchgeführten Versuch zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei 45 nmol (PLK-Index: 3,29) und 90 nmol (PLK-Index: 8,12) für PdCl₂, →(Abb. 4.1.3).

Für **Na₂PdCl₄** zeigten sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe bei 45 nmol (PLK-Index: 3,63), 90 nmol (PLK-Index: 5,91) und 180 nmol (PLK-Index: 7,12), →(Abb. 4.1.4).

Für **Na₂PdCl₆** zeigten sich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe bei 45 nmol (PLK-Index: 2,99), 90 nmol (PLK-Index: 3,41) und 180 nmol (PLK-Index: 6,07), →(Abb. 4.1.5).

Zur Demonstration der T-Zell-Abhängigkeit wurde beispielhaft an K₂[PdCl₄] Versuche mit (NMRI nu/nu) und (NMRI +/-nu) Mäusen durchgeführt. Dabei wurden in der (NMRI nu/nu)-Gruppe 180 nmol appliziert. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Gruppe von BALB/c-Mäusen mitgeführt, die ebenfalls 180 nmol erhielten. Es zeigte sich erwartungsgemäß kein PLK-Index-Anstieg in der (NMRI nu/nu)-Gruppe (PLK-Index: 1,0), da diese athymen Mäuse keine T-Zell-abhängigen Reaktionen ausbilden können. Die BALB/c-Kontrolle dagegen, zeigte einen sehr deutlichen, signifikanten Unterschied im PLK-Index (10,65) im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (PLK-Index: 1,13).

Ein zweiter Versuch mit den phänotypisch normalen (NMRI +/nu)-Mäusen wurde ebenfalls durchgeführt. Es wurden gleichfalls 180 nmol verabreicht. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Test- (PLK-Index: 4,86) und der Kontrollgruppe (PLK-Index: 0,97), →(Abb. 4.1.6), da dieser Mäusestamm die Fähigkeit zu T-Zell-abhängigen Immunreaktionen nicht verloren hat.

Mit C57/Bl6-Mäusen wurde das immunologische Ansprechen eines weiteren Mausinzuchtstammes auf $K_2[PdCl_4]$ getestet. Die Mäuse erhielten 180 nmol dieser Verbindung, die sich in Experimenten mit BALB/c-Mäusen als sehr immunogen erwiesen hatte. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Test- (PLK-Index: 6,05) und Kontrollgruppe (PLK-Index: 0,9), →(Abb. 4.1.7).

LERCHENMÜLLER [75] ermittelte für Platinverbindungen subimmunogene Dosen, d. h. mit diesen Dosierungen wurden in der Primärantwort des PLK-Testes kein Indexanstieg beobachtet. Für $K_2[PdCl_4]$ sollte dies analog durchgeführt werden. In einem weiteren Versuch wurde BALB/c-Mäusen 10 nmol (PLK-Index: 1,1), 12 nmol (PLK-Index: 1,97) und 16,5 nmol (PLK-Index: 2,27) dieser Verbindung verabreicht. Für keine dieser Dosierungen war ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PLK-Index: 1,5) festzustellen. Damit wurde die Dosierung von 16,5 nmol als subimmunogen bestimmt und zur Restimulation im Adoptiv-Transfer verwendet.

Makroskopisch waren bei keiner Verbindung entzündliche Veränderungen an der Einstichstelle feststellbar. Auch allgemein-toxische Wirkungen wurden in keinem Fall beobachtet.

Histologien der Lymphknoten und Pfoten wurden nicht durchgeführt, da analoge Veränderungen zu den Experimenten von LERCHENMÜLLER [75] erwartet werden konnten. Dort zeigte sich eine frühe Einwanderung von polymorphkernigen Zellen, eine Zunahme der Zelldichte der parakortikalen Zone mit einem Maximum am 6. Tag und eine Zellproliferation in der kortikalen Zone mit Ausbildung von Sekundärfollikeln, die insgesamt als Graft-versus-Host-ähnlichen Pathomechanismus bzw. als PLK-spezifische Veränderungen bewertet wurden [75].

4.2 Sekundärantwort des PLK-Testes mit $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$

Die immunogene Potenz von $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ wurde in vorherigen Experimenten mittels Primärantwort im PLK-Test aufgezeigt und unter 4.1 beschrieben. Um zu ermitteln, ob es sich um eine Palladium-spezifische Abwehrreaktion handelt, oder mitogene Effekte der Primärantwort des PLK-Testes zugrunde liegen, wurde eine Sekundärantwort des PLK-Testes durchgeführt [68, 69, 79]. Nach vorausgegangener Sensibilisierung wird experimentell versucht, bei erneutem Kontakt mit nur subimmunogenen Dosen eine anamnestiche Abwehrreaktion auszulösen.

Mäuse des Stammes BALB/c wurden 11 Wochen über die nasale Route mit je 3,6 nmol (1,3 µg/ 25 µl) $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ pro Woche, bzw. die Kontrollgruppe mit NaCl 0,9%, behandelt. Es schloß sich ein sechswöchiges behandlungsfreies Intervall an. Nach Abklingen der Primärantwort erhielten die Versuchstiere in der 18. Woche eine suboptimale Restimulationsdosis von 16,5 nmol $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$, 16,5 nmol K_2PtCl_4 in je 40 µl NaCl 0,9% oder 40 µl NaCl 0,9% s.c. in die linke Hinterpfote. Die Platinverbindung wurde zur Abklärung einer möglichen Kreuzreaktion eingesetzt.

Die Möglichkeit einer umgekehrten Kreuzreaktion zeigte PAGELS [98] in seinen Versuchen. Er sensibilisierte Mäuse mit Platinverbindungen, und konnte demonstrieren, dass diese Tiere eine positive Zweitreaktion auf Palladiumsalze entwickelten.

Die Injektionslösungen wurden, wie unter 2.3 B beschrieben, angesetzt. Am Tag 2 nach Restimulation wurden die Tiere unter Äthernarkose getötet, die poplitealen Lymphknoten präpariert, seitengetrent in PBS aufgenommen und ausgewertet.

Die Auswertung ergab signifikante Unterschiede zur entsprechenden NaCl-vorbehandelten Gruppe, bei der Restimulation mit 16,5 nmol $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ (PLK-Index: 3,2 versus 1,2; $p < 0,01$) und bei Restimulation mit 16,5 nmol K_2PtCl_4 (PLK-Index: 2,4 versus 1,2; $p < 0,01$). Kein signifikanter Unterschied ergab sich bei der $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ -vorbehandelten Gruppe bei Restimulation mit 16,5 mmol $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ (PLK-Index 3,2) im Vergleich zur Restimulation mit 16,5 mmol K_2PtCl_4 (PLK-Index 2,4). Abb. 4.2 zeigt die graphische Darstellung dieser Ergebnisse. Um eine unspezifische

positive Reaktion auszuschließen, erhielten sowohl NaCl-vorbehandelte, als auch Palladium-vorbehandelte Tiere 40 µl NaCl 0,9% als Restimulationsdosis. Sowohl in der NaCl-vorbehandelten Gruppe (PLK-Index: 1,4), als auch in der Palladium-vorbehandelten Gruppe (PLK-Index: 1,0) ließen sich keine positiven Reaktionen auslösen.

4.3 Nachweis einer „Pd“-spezifischen Sensibilisierung im

Adoptiven-Transfer-PLK-Test

Ziel dieses Experimentes war es, mit dem Adoptiven-Transfer-PLK-Test die systemische, Palladium-spezifische und übertragbare T-Zell-abhängige Sensibilisierung von BALB/c-Mäusen gegen Palladium nachzuweisen. Um eine Sensibilisierung zu erreichen, wurden die Tiere über 11 Wochen nasal mit je 3,5 nmol $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ bzw. $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ in 25 µl NaCl bzw. mit NaCl 0,9 % behandelt. Es folgte in der $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ -Gruppe ein sechswöchiges, in der $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ ein vierzehnwöchiges behandlungsfreies Intervall. Anschließend wurden die Spendertiere getötet, ihre Milzen präpariert, eine geeignete Zellsuspension der Milzzellen hergestellt und diese anschließend in syngene, unbehandelte Empfängertiere s.c. in die linke Hinterpfote injiziert. Durch Injektion einer suboptimalen Palladium-Dosis am Tag 2 nach Zellübertragung sollte untersucht werden, ob eine Zweitantwort in den Empfängertieren ausgelöst werden kann. Weiterhin sollte durch Injektion einer subimmunogenen Dosis einer differenten Palladiumverbindung (PdCl_2) und der Injektion einer suboptimalen Platindosis (K_2PtCl_4) untersucht werden, ob eine Kreuzreaktion in den Empfängertieren auslösbar ist.

Die Ergebnisse der Adoptiv-Transfer-PLK-Testes sind in Abb. 4.3.1 und 4.3.2 graphisch dargestellt.

Im ersten Adoptiv-Transfer-PLK-Test wurden die Spendertiere mit $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ bzw. in der Kontrolle mit NaCl langzeitbelastet. Bei Restimulation der Milzzellen-Empfänger mit der subimmunogenen Dosis von 16,5 nmol $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ ergaben sich signifikante Unterschiede der PLK-Indizes der Pd- vorbehandelten Gruppe zur NaCl-vorbehandelten Gruppe (3,6 versus 1,6; $p \leq 0,018$).

Bei Injektion von 16,5 nmol PdCl_2 in die Milzzellen-Empfängertiere ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den PLK-Indizes der Pd-vorbehandelten und der Kontrollgruppe (3,8 versus 1,7; $p \leq 0,01$).

Bei Restimulation der Pd-vorbehandelten und der NaCl-behandelten Empfängertiere mit K_2PtCl_4 ergaben sich gleichfalls signifikante Unterschiede der PLK-Indizes (3,3 versus 1,6; $p \leq 0,014$). Zwischen den Gruppen je mit $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ -Vorbehandlung und Restimulation mit $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ (PLK-Index 3,6) versus Restimulation mit K_2PtCl_4 (PLK-Index 3,3) ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Möglicherweise zeigt sich hier, dass es eine Kreuzreaktion, sowohl zwischen verschiedenen Palladiumsalzen, als auch zwischen Palladium- und Platinverbindungen gibt. Diese Ergebnisse zeigten sich analog zur PLK-Zweitantwort, mit der gleichfalls eine Kreuzreaktion zwischen Palladium-vorbehandelten Tieren und Platin gezeigt werden konnte (siehe 4.2).

Demgegenüber war es durch Injektion von NaCl 0,9% in Empfängertiere, weder bei den NaCl-vorbehandelten, noch bei den Pd-vorbehandelten Tieren, möglich, eine PLK-Zweitantwort auszulösen. Der PLK-Index bei der ersten Gruppe lag bei 1,2, bei der zweiten Gruppe lag der PLK-Index bei 1,6.

Um das Sensibilisierungspotential einer zweiten Palladiumverbindung auszutesten, wurden die Spendertiere im zweiten Adoptiv-Transfer-PLK-Test mit $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ bzw. NaCl langzeitbehandelt. Analog dem vorbeschriebenem Experiment, wurde versucht, in den Milzzellen-Empfängertiere mit suboptimalen Dosierungen eine PLK-Zweitantwort auszulösen (Abb. 4.3.2).

Bei der Restimulation mit 12 nmol $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ zeigten sich signifikante Unterschiede der PLK-Indizes der Pd-vorbehandelten zur NaCl-vorbehandelten Gruppe (3,69 versus 1,9; $p \leq 0,048$).

Bei Restimulation mit 16,5 nmol der gleichen Verbindung zeigten sich zwar differente PLK-Indizes der beiden Gruppen, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (Pd-Gruppe / PLK-Index: 2,22; NaCl-Gruppe / PLK-Index: 1,88).

Weder bei den Pd-vorbehandelten (PLK-I.: 1,59), noch bei den NaCl-vorbehandelten Empfängertiere (PLK-I.: 1,68), war durch NaCl-Injektion eine Zweitantwort auslösbar.

4.4 *Nachweis der Induktionsphase einer Kontaktsensibilisierung nach topischer Applikation von $K_2[PdCl_4]$ im Aurikulären-Lymphknoten-Test (ALK-Test)*

Nachdem durch subkutane und nasale Belastung eine Sensibilisierung gegen Palladiumsalze nachgewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob eine Sensibilisierung auch durch topische Applikation auslösbar ist. Die Exposition durch topische Applikation ist in der Humanmedizin der eigentlich klinisch relevante Sensibilisierungsweg, wohingegen die s.c. und nasale Belastung mit Palladiumverbindungen artifizielle Systeme darstellen.

Mit dem ALK-Test sollte hier die Induktionsphase einer kontaktallergischen Reaktion untersucht werden. Die Ermittlung des ALK-Indexes, als Quotienten aus den Mittelwerten der Gesamtzellzahlen der aurikulären Lymphknoten der Palladium-behandelten, gegen die mit dem Lösungsmittel DAE-behandelten Gruppen, liefert ein quantitatives Maß für die Induktionsphase einer kontaktallergischen Reaktion.

4.4.1 Nachweis der Induktionsphase im ALK-Test

Mäuse des Stammes BALB/c wurden in Gruppen von 3-5 Tieren eingeteilt. Aufgrund der akzeptablen Löslichkeit der Verbindung, wurde $K_2[PdCl_4]$ als zu untersuchende Substanz ausgewählt. Die Mäuse wurden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen mit $K_2[PdCl_4]$ -Lösungen von 4%, 2% und 1% auf der Außenseite ihrer Ohren behandelt. Als Lösungsmittel wurde DAE eingesetzt (siehe 2.2.2). Es wurde Oxazolone 1% in DAE als Positiv-Kontrolle mitgeführt, da es sich bei verschiedenen Autoren als potentes Kontaktallergen etabliert hat [75, 80, 81]. Nach einem behandlungsfreien Intervall von einem Tag fand die Auswertung statt. Es wurde je ein drainierender, retroaurikulärer Lymphknoten pro Seite entnommen.

Es zeigten sich signifikant immunogene, dosisabhängige Zellzahlerhöhungen durch die topische Applikation von $K_2[PdCl_4]$.

Es ergaben sich signifikante Unterschiede der mittleren Zellzahlen der

$K_2[PdCl_4]$ 4%-Gruppe (581×10^6 Zellen) zur Kontrollgruppe mit DAE ($252,25 \times 10^6$ Zellen), $p \leq 0,0357$. Der **ALK-Index** lag bei **2,3**.

Die mittlere Zellzahl der mit **2% $K_2[PdCl_4]$** behandelten Gruppe lag bei $524,75 \times 10^6$. In Korrelation gesetzt zur Kontrollgruppe (DAE) mit $252,25 \times 10^6$ Zellen, ergab sich ein ALK-Index von **2,1**. Die Signifikanz lag bei $p \leq 0,0159$.

Die mittlere Zellzahl der mit **1% $K_2[PdCl_4]$** behandelten Gruppe lag bei $422,8 \times 10^6$. In Korrelation zur Kontrollgruppe (DAE) mit $252,25 \times 10^6$ Zellen, ergab sich ein ALK-Index von **1,6**. Die Signifikanz lag bei $p \leq 0,032$.

Die mittlere Zellzahl der Positiv-Kontrolle mit dem potenten Allergen **Oxazolone** lag bei $1871,6 \times 10^6$, der mit der DAE-Kontrolle gebildete ALK-Index lag bei **7,4**. Das Signifikanzniveau wurde ermittelt mit $p \leq 0,0079$.

Die lokale Zellproliferation in den drainierenden, retroaurikulären Lymphknoten, die sich in dem ermittelten Zellzahlanstieg widerspiegelt, ist Ausdruck der durch $K_2[PdCl_4]$ ausgelösten Induktionsphase einer Kontaktsensibilisierung [83].

Die Ergebnisse sind in Abb. 4.4.1 dargestellt.

4.4.1.2 Histologische Veränderungen nach Auslösung einer Kontaktallergie

4.4.2 Kinetik der Induktionsphase einer kontaktallergischen Reaktion

Um den Verlauf der Induktionsphase einer kontaktallergischen Reaktion zu untersuchen, werteten wir die Belastung mit 2% $K_2[PdCl_4]$ zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus. Mäuse des Stammes BALB/c wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit dieser 2%-igen Lösung bzw. mit DAE und Oxazolone 1%, behandelt. Ein behandlungsfreier Tag wurde eingehalten. Am darauffolgenden Tag (Tag 6 des Experimentes) fand die erste Auswertung statt, an Tag 8 fand die zweite Auswertung statt. Am Tag 10 wurde die letzte Auswertung durchgeführt.

Die erste Auswertung am Tag 6 des Experimentes ergab eine mittlere Zellzahl von $663,2 \times 10^6$ für die $K_2[PdCl_4]$ 2%-Gruppe. Verglichen mit der Zellzahl der DAE-Kontrollgruppe (mittlere Zellzahl = $227,6 \times 10^6$), ergab sich ein ALK-Index von 2,9. Das Ergebnis ist mit $p \leq 0,0079$ signifikant.

Die mittlere Zellzahl der 1% Oxazolone-Gruppe ermittelten wir mit 1637×10^6 . Der mit DAE errechnete ALK-Index lag bei 7,2. Das Ergebnis ist mit $p \leq 0,0079$ signifikant.

Bei der zweiten Auswertung an Tag 8 des Experimentes ermittelten wir für die $K_2[PdCl_4]$ 2%-Gruppe eine mittlere Zellzahl von $621,6 \times 10^6$. Die mittlere Zellzahl der Kontrollgruppe (DAE) lag bei $200,3 \times 10^6$. Der daraus errechnete ALK-Index lag bei 3,1. Das Ergebnis war mit $p \leq 0,0079$ signifikant.

Die mittlere Zellzahl der 1% Oxazolone-Gruppe ermittelten wir mit 1582×10^6 . Der mit DAE errechnete ALK-Index lag bei 7,9. Das Ergebnis war mit $p \leq 0,0079$ signifikant.

Bei der letzten Auswertung an Tag 10 des Experimentes ermittelten wir für die $K_2[PdCl_4]$ 2%-Gruppe eine mittlere Zellzahl von $445,2 \times 10^6$. Die mittlere Zellzahl der Kontrollgruppe (DAE) lag bei $167,8 \times 10^6$. Der daraus errechnete ALK-Index lag bei 2,65. Das Ergebnis war mit $p \leq 0,0079$ signifikant.

Die mittlere Zellzahl der 1% Oxazolone-Gruppe ermittelten wir mit 1274×10^6 . Der mit DAE errechnete ALK-Index lag bei 7,6. Das Ergebnis war mit $p \leq 0,0079$ signifikant.

Damit ergaben sich die größten ALK-Indizes für den Tag 8 des ALK-Testes, d.h. am vierten Tag nach Belastung war die Zellproliferation am ausgeprägtesten.

Die Ergebnisse sind in Abb. 4.4.2 dargestellt.

5. Diskussion

Allergische Reaktionen auf verschiedenste niedermolekulare Verbindungen, wie Palladiumsalze, sind vor allem in der allergologischen Praxis keine Seltenheit mehr. Das aus der gleichen Nebengruppe stammende Platin ist für seine IgE-vermittelte Typ I-Allergien bekannt, die bei 50 % der exponierten Arbeitern in Platin-Raffinerien auftritt [75]. Weitere bekannte Beispiele für immunologische Reaktionen auf niedermolekulare Verbindungen, die durch einen positiven PLK-Test belegt wurden, sind das Zytostatikum Streptozotocin [69], das Antirheumatikum D-Penicillamin [68], Au-III-Verbindungen, die als Metabolite aus Goldverbindungen in der Rheumatherapie entstehen [73] und die Schwermetallverbindung HgCl_2 [70].

Die klinische Symptomatik, die Palladiumverbindungen verursachen, stellt sich meist in Form von T-Zell-abhängigen Typ IV-Reaktionen dar. Falls nicht nur isoliert positive Reaktionen im Patch-Test ohne entsprechende klinische Symptomatik vorliegen, sind die häufigsten Manifestationen der Palladiumallergie die Kontaktdermatitis in unterschiedlichster Ausprägung, die Kontaktmukositis oder der orale Lichen planus. Dies ist durch zahlreiche Fallberichte und klinische Studien gut belegt (siehe Punkt 1.4.2).

MUROCH& PEPYS [46] gelang es, die bisher einzige IgE-vermittelte Typ I-Reaktion auf Platin beim Menschen, nachzuweisen. Bei 2 von 306 Platin-Raffineriearbeitern konnte er im Prick-Test eine positive Reaktion auf Palladium zeigen. Es handelte sich dabei aber nicht um eine solitäre Palladiumreaktion, sondern es traten gleichzeitig positive Reaktionen auf $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$, Rhodium und Ruthenium auf, so dass sich die Frage einer möglichen Kreuzreaktion stellt.

Gegen eine Kreuzreaktion der verschiedenen Übergangsmetalle spricht das Ergebnis im Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST). Dort ließ sich bei beiden Prick-Test-positiven Arbeitern Palladium-spezifisches IgE nachweisen.

Die wenigen bisher durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen wurden vor allem mit Meerschweinchen und Katzen durchgeführt (siehe 1.3.2).

Die von TAUBLER [26] durchgeführte intravenöse Injektion von Palladiumovalbuminlösung oder Palladium-Meerschweinchenalbuminlösung in Meerschweinchen zeigte eine Sensibilisierung vom Typ IV.

Demgegenüber stehen Ergebnisse aus Untersuchungen von TOMILETS mit Katzen und Meerschweinchen, der, abhängig vom Versuchsdesign, neben Typ IV-Reaktionen ausgeprägte Typ I-Reaktionen beobachten konnte [27, 28].

WAHLBERG & BOMAN zeigten mit dem Guinea-Pig-Maximization-Test (GPMT), dass die allergenisierende Potenz von Palladiumchlorid größer einzuschätzen ist als die von Nickelsulfat. Hierbei handelte es sich um T-Zell-abhängige Typ IV-Reaktionen [32].

BIAGINI et al. versuchte mit der intrakutanen Injektion von Serum sensibilisierter Patienten in Primaten (Passive kutane Anaphylaxie/ PCA-Test) mittels der zirkulierenden Pt-spezifischen IgE-Antikörper, eine mögliche Kreuzreaktion mit Palladium nachzuweisen. In zwei Fällen gelang ihm dies. Ein Serum lieferte sogar nur auf Palladium eine positive Reaktion im PCA-Test, war dagegen negativ auf entsprechende Platinverbindungen [66].

Ziel dieser Arbeit war es, erstmals im Mausmodell die sensibilisierende Potenz einer Palladiumverbindungen zu untersuchen. Die Maus scheint als Versuchstier besonders geeignet, da sie immunbiologisch und genetisch sehr gut untersucht und ihr Immunsystem funktionell dem des Menschen ähnlich ist.

5.1 Analyse zur sensibilisierenden Potenz von Mäusen gegen verschiedene

Palladiumverbindungen im PLK-Test

Die immunogene Potenz von $K_2[PdCl_4]$, $(NH_4)_2[PdCl_6]$, $PdCl_2$, Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 sollte in Primärantworten des PLK-Testes untersucht werden. Für das aus der gleichen Nebengruppe stammende Element Platin konnte eine deutliche allergene Potenz in dieser Versuchskonstellation von SCHUPPE und LERCHENMÜLLER gezeigt

werden. Sie demonstrierten eine T-Zell-abhängige, spezifische und genetisch kontrollierte Immunantwort auf $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$ [74], Na_2PtCl_4 , Na_2PtCl_6 und Cis-Platin [75].

Mit Hilfe der Zweitantwort des PLK-Testes sollte für die Verbindung $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ untersucht werden, ob es sich bei der positiven PLK-Reaktion in der Primärantwort um eine lokale, „Pd“-spezifische und T-Zell-abhängige Immunantwort handelt.

Mit dem Adoptiv-Transfer-PLK-Test sollte als Gegenstück zur lokalen T-Zell-Abhängigkeit in der Zweitantwort nun die Frage der systemischen, „Pd“-spezifischen und T-Zell-abhängigen Immunantwort untersucht werden. Um dies abzuklären, wurden Mäuse einer chronischen Behandlung mit $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ und $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$ unterzogen, um anschließend diese immunkompetenten Zellen durch Transfer der Milzzellen auf unbehandelte, syngene Empfänger übertragen zu können.

Die in diesen Versuchen verwendeten Mauseinzuchtstämme BALB/c (H-2^d) und C57Bl/6 (H-2^b), wurden in Versuchen mit $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ und $[\text{PtCl}_6]^{2-}$ -Verbindungen von SCHUPPE [74] als „Responder“-Stämme identifiziert.

Primärantwort durch verschiedene Palladiumsalze:

Die getesteten Verbindungen $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$, $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$, PdCl_2 , Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 zeigten alle eine dosisabhängige Zellzahlerhöhung in den Primärantworten des PLK-Testes. Bereits einmalige Injektion geringer Mengen im nmol-Bereich induzieren eine signifikante Reaktion im drainierenden Lymphknoten, wobei die allergische Reaktion in der Primärantwort nicht sicher von einer toxisch-irritativen Reaktion abgegrenzt werden kann. Die deutlichsten Reaktionen zeigten sich jeweils bei 180 nmol der Verbindungen pro Tier. Die suboptimale Dosierung ermittelten wir unterschiedlich für die verschiedenen Verbindungen. Bei den getesteten Dosierungen zeigten sich erste signifikante Reaktionen bei 9 nmol für $\text{K}_2[\text{PdCl}_4]$, 18 nmol für $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ und 45 nmol für PdCl_2 , Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 .

Damit ist die Immunogenität von Chloropalladaten im vorgestellten Mausmodell mit derjenigen analoger Platinverbindungen durchaus vergleichbar [74], [75]. Diese werden als extrem potente Aeroallergene eingestuft. (*Poster Schuppe ADF, Würzburg'94*)

Mittels Messung der Inkorporation von ^3H -Thymidin ermittelte H. GLEICHMANN für Diphenylhydantoin, dass die Zunahme der Zellzahl auf der Injektionsseite im PLK-Test im Wesentlichen auf einer lokalen Lymphozyten-Proliferation beruht, und nicht auf eine Rekrutierung zirkulierender Lymphozyten (^{51}Cr -markiert) zurückzuführen ist [84].

Für D-Penicillamin, Streptozotocin und die Schwermetallverbindung HgCl_2 wurde dies in anderen Experimenten bestätigt [68-70].

Aufgrund dieser Demonstration ist davon auszugehen, dass es sich auch bei der Zellzahlerhöhung im PLK-Test auf Palladium um eine echte lokale Zellproliferation handelt. Somit ist eine T-Zell-Abhängigkeit der beschriebenen Reaktionen anzunehmen. Diese Eigenschaft, sowie die Koppelung an bestimmte MHC-Allele (Responder-Eigenschaft bestimmter Mäusestämme) und die von anderen Autoren beschriebene histologischen Veränderungen bei PLK-Reaktionen, machen einen Graft-versus-Host-ähnlichen Pathomechanismus für diese niedermolekularen Verbindungen wahrscheinlich [71, 85, 86].

T-Zell-Abhängigkeit der durch Palladium induzierten Immunantwort:

Um die T-Zell-Abhängigkeit zu verdeutlichen, wurden Versuche mit T-Zell-kompetenten und T-Zell-inkompetenten „Responder“-Mäusen durchgeführt. Dazu wurden Mäuse der Auszuchtstämme NMRI nu/nu (T-Zell-defizient) und deren Geschwister NMRI +/nu (T-Zell-kompetent) eingesetzt. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass die immunkompetenten Mäuse eine deutliche, signifikante PLK-Reaktion zeigten, die der Reaktion der Mauseinzuchtstämme BALB/c und C57/Bl6 entspricht (siehe 4.1). Die immundefizienten Geschwistertiere dagegen, waren nicht in der Lage, eine T-Zell-abhängige, positive Reaktion in der Primärantwort des PLK-Testes auszulösen, da sie athym sind, und somit nicht über die Möglichkeit T-Zell-abhängiger Immunreaktionen verfügen.

Dass die T-Zell-Kompetenz der „Responder“-Tiere eine absolut notwendige Voraussetzung für eine positive Reaktion in Primärantworten des PLK-Testes ist, zeigte E.GLEICHMANN für eine Vielzahl niedermolekularer Chemikalien [71].

SCHUPPE [74] demonstrierte den gleichen Sachverhalt für $(\text{NH}_4)_2[\text{PtCl}_6]$ mit den identischen Mausstämmen NMRI nu/nu und NMRI +/nu.

Konzepte zur Antigenbindung, Prozessierung und Präsentation:

Wahrscheinlich kommt es nach s.c. Injektion der Palladiumverbindungen zur Bindung dieser an Trägermoleküle. Über den Hapten-Charakter dieser niedermolekularen Verbindungen herrscht unter den verschiedenen Autoren weitgehend Übereinstimmung. Zu den dann folgenden Abläufen aber gibt es unterschiedliche Modellvorstellungen.

MURDOCH & PEPYS postulieren ein Trägermolekül (humanes Serumalbumin), dass nach Bindung des Haptens als Fremdpeptid erkannt wird, und zur immunologischen Abwehr führt. Diese veränderten Gesamtkomplexe werden von den Autoren als „new antigenic determinants/ NADS“ bezeichnet [87].

Die Bindung der Elemente der Platingruppe an Trägermoleküle kommt möglicherweise über ihre Affinität zu Sulfhydrylgruppen von Proteinen zustande. Gängige Modellvorstellung ist die Konjugation von Methionin-, Cystein- und Histidinbausteinen der Proteine zu immunogene Komplexen [87]. NIELSON et al. demonstrierten eine solche Bindung des Palladiums an Metallothionine [88].

Die Affinität der Platingruppenelemente zu Sulfhydryl-, Carboxyl- und Aminogruppen halten auch FREEDMAN [89] und SCHULZE- WERNINGHAUS [90] für einen möglichen Mechanismus, um die Bindung oder Modifikation von Membran- oder intrazellulären Proteinen, zu induzieren.

Werden diese „prozessierten“ Proteine gemeinsam mit MHC-Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), z.B. Langerhans-Zellen, präsentiert, könnte dies nach Einwanderung der präsentierenden Zellen in die regionären Lymphknoten dort zu einer Aktivierung von T_H-Zellen führen, die ihrerseits die weitere Immunantwort induzieren und modulieren [91-93].

Diese T_H-Zell-Aktivierung ist für einige andere niedermolekulare Chemikalien experimentell gut belegt [68, 69, 73, 94].

Auch BLOKSMA et al. [95] sind der Ansicht, dass die Affinität niedermolekularer Verbindungen zu den MHC-Molekülen zu gering ist, um selbständig eine immunogene Wirkung auszulösen.

Sie postuliert 3 mögliche Mechanismen, die zu einer immunogenen Wirkung von niedermolekularen Verbindungen führen können:

Die erste Möglichkeit besteht in einer externen Bindung der Haptene an Selbst-Peptide. Eine weitere Möglichkeit besteht in Aufnahme und Prozessierung der Selbst-Peptide, die dazu führt, dass dieser Komplex auf der Oberfläche der Zellen präsentiert wird, und von den T-Zellen als Fremdpepitop erkannt wird.

Der dritte denkbare Mechanismus zur Entstehung von immunogenen Palladium-Komplexen beinhaltet die Präsentation von kryptischen Peptiden (durch neuraminsäurehaltige Kohlenhydrate maskierte Peptide), welche durch Prozessierung solcher veränderter Selbst-Peptide entstehen und ihrerseits die T-Zell-Aktivierung auslösen.

Nach Entstehung dieser immunogenen Palladium-Komplexe, kommt es zur T_H -Zell-Aktivierung, die bei der Induktion sämtlicher Immunreaktionen von Typ-I bis Typ-IV, eine zentrale Rolle einnimmt.

In Abhängigkeit von der Aktivierung unterschiedlicher T_H -Zell-Subpopulationen kommt es bei Aktivierung von T_{H1} -Zellen zur Zytokin-vermittelten zellulären Immunität, bei Aktivierung von T_{H2} -Zellen hingegen zur Zytokin-vermittelten humoralen Immunität mit Produktion von IgE und anderen Immunglobulinen. Somit können Pd-spezifische T_H -Zellen durch B-Zell-Aktivierung, die Bildung von Autoantikörpern induzieren, oder zelluläre Immunreaktionen vom verzögerten Typ induzieren, indem sie phagozytierende Zellen durch Chemotaxis anlocken und diese aktivieren [92, 93].

Es ist wahrscheinlich, dass diese Pathomechanismen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und bei der Entstehung von Allergien gegen exogene Stoffe, wie Medikamente oder Umweltschadstoffe, wesentlich beteiligt sind.

Der PLK-Test mißt mittels seiner Parameter nur die Endpunkte der allergenen oder autoimmunen Reaktion, ohne zwischen den unterschiedlichen Typen unterscheiden zu können. Nichtsdestotrotz sind die quantitativen und qualitativen Veränderungen im drainierenden Lymphknoten durch den PLK-Test objektiv meßbar. Neben der Zellzahl

sind der [^3H]-Thymidin-Einbau und die Immunglobulinproduktion weitere Optionen, um die Wirkung einer fraglich immunogene Substanz zu untersuchen. Bei fraglich positiven PLK-Antworten können Histopathologie und Immunhistochemie zur Aufklärung beitragen. Mit Hilfe der FACS-Analyse (Fluoreszenzaktivierter Zellsorter) lassen sich B- und T-Zell-Proliferationsraten ermitteln, bzw. der Anteil, der CD4+-Zellen, die eine T-Zell-abhängige Reaktion anzeigen [95].

Für das, aus der gleichen Nebengruppe wie Palladium stammende Platin, konnten SCHUPPE et al. diesen Sachverhalt dokumentieren. Sie führten eine flowzytometrische Untersuchung der Zellsuspensionen, von durch einmalige Injektion mit $\text{Na}_2(\text{PtCl}_6)$ -vorbehandelten Mäusen durch. Es zeigte sich, dass der Anteil der proliferierenden Zellen (PCNA+-Zellen) in der Platin-behandelten Gruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe 20-fach erhöht war. Die Phänotypisierung dieser proliferierenden Zellen ergab, dass der Großteil dieser PCNA+-Zellen CD4+ war [96]. Diese Ergebnisse bestätigen die T-Zell-Abhängigkeit der positiven PLK-Reaktion.

Sekundärantwort/Nachweis der Allergie für verschieden Palladiumverbindungen im PLK-Test:

Bei Verzicht auf immunhistochemische Verfahren besteht die Möglichkeit, die lokale oder systemische, Pd-spezifische T-Zell-Abhängigkeit mittels **PLK-Zweitantwort** zu demonstrieren, und damit einen ebenfalls denkbaren mitogenen Effekt der Pd-Komplexverbindung mit polyklonaler Aktivierung von T-Zellen, auszuschließen bzw. die allergische Reaktion nachzuweisen.

Die Auslösbarkeit einer Zweitantwort durch subimmunogene Dosierungen nach abgeklungener Primärantwort, gilt als Demonstration einer lokalen, T-Zell-abhängigen und damit Pd-spezifischen Immunreaktion [67-71, 73, 74].

Dies konnte für $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ demonstriert werden, da Mäuse, die einer 11-wöchigen Langzeitbehandlung unterzogen worden waren, durch eine subimmunogene Dosis der gleichen Verbindung, eine signifikante Zellzahlerhöhung der poplitealen Lymphknoten aufwiesen.

Ein weiterer Grund, die Vorstellung eines einfachen mitogenen Effektes zu verwerfen, sind in-vitro Ergebnisse mit humanen Lymphozyten. Im Gegensatz zu anderen

Metallkomplexen waren Chloropalladate und auch Chloroplatinate nur geringfügig in der Lage, mitogene Effekte bei humanen Lymphozyten zu induzieren [97]. Dieses Ergebnis konnten SCHUPPE et al. [96] für die Chloroplatinate bestätigen.

Einer zweiten Gruppe von Pd-langzeitbehandelten Tieren wurde eine subimmunogene Dosierung vom Chloroplatinat K_2PtCl_4 appliziert. Es zeigte sich ein signifikanter Zellanzahlanstieg, der jedoch in seinem Ausmaß deutlich unter dem PLK-Index der Palladium-restimulierten Gruppe lag. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch beim Adoptiv-Transfer-PLK-Test, in dem ebenfalls die Restimulation einer Palladium-vorbehandelten Gruppe durch K_2PtCl_4 gezeigt werden konnte (siehe unten). Eine positive PLK-Reaktion in umgekehrter Richtung (d.h. Platin-vorbehandelt und mit Chloropalladaten restimuliert) in der PLK-Zweitantwort und im Adoptiv-Transfer-PLK-Test konnte PAGELS [98] demonstrieren.

Möglicherweise deutet dies auf eine Kreuzreaktivität zwischen den beiden Schwermetallverbindungen hin, die ihre Ursache in einem ähnlichen Sensibilisierungsmechanismus findet.

Um der Frage einer, durch Langzeitexposition induzierten, systemischen, Pd-spezifischen, zellulären Immunantwort nachzugehen, wurde der

Adoptiv-Transfer-PLK-Test durchgeführt. Im Hinblick auf eine mögliche inhalative Sensibilisierung durch Pd-Salze beim Menschen, wurden die Chloropalladate nasal verabreicht. Es wurden Milzzellen Pd-behandelter BALB/c-Mäuse in syngene, unbehandelte Empfängertiere transferiert. Anschließend wurde mit den Verbindungen der Langzeitbehandlung ($(NH_4)_2[PdCl_6]$; $K_2[PdCl_4]$) in suboptimaler Dosierung restimuliert. Um der Frage einer möglichen Kreuzreaktivität nachzugehen, wurden die $(NH_4)_2[PdCl_6]$ -vorbehandelten Tiere auch mit einem Chloroplatinat restimuliert.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die suboptimale Dosierung der jeweiligen Verbindung nur in der Lage ist, eine positive Reaktion im PLK-Test zu induzieren, wenn die Spendertiere in der nasalen Langzeitbehandlung mit Palladium exponiert wurden. Die Tiere, die Milzzellen der NaCl-behandelten Spendertiere erhielten, waren nicht in der Lage, durch die suboptimale Palladium-Dosis eine positive Reaktion zu zeigen.

Interessanterweise erhielten wir im Adoptiv-Transfer-PLK-Test mit $K_2[PdCl_4]$ mit der suboptimalen Dosierung von 12 nmol ein signifikantes Ergebnis, in der Dosierung von 16,5 nmol war das Ergebnis jedoch nicht signifikant.

Möglicherweise existiert zur Restimulation sensibilisierter T-Zellen eine optimale Epitopdichte. Wird dieses Optimum durch höhere Palladium-Testkonzentrationen überschritten, könnte es zur Bildung von Membran-Antigen-Komplexen kommen, die die Interaktion zwischen den Pd-spezifischen T-Zellen und den antigenpräsentierenden Zellen behindert. KUBICKA-MURANYI [94] gelang es, für $HgCl_2$ zu zeigen, dass Komplexverbindungen oder deren Metabolite, mit unterschiedlicher Affinität an verschiedenste zelluläre Proteine gebunden werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Dosierung von 12 nmol um eine „optimalere“ Epitopdichte, die eine bessere Interaktion von Antigen und Zellrezeptor ermöglicht, als dies bei der Dosis von 16,5 nmol der Fall war.

Insgesamt ist wahrscheinlich, dass die Pd-sensibilisierten T-Zellen, die Anteile der transferierten Milzzellen der Spender ausmachen [73, 94], durch Chloropalladate in suboptimaler Dosierung, restimulierbar waren.

Dieser, von KLINKHAMMER [69] entwickelte Adoptiv-Transfer-PLK-Test, ist allgemein anerkannt als ein die T-Zell-Abhängigkeit demonstrierendes Versuchssystem [95].

Somit scheint eine Pd-spezifische, T-Zell-abhängige, und damit zelluläre Immunreaktion, die sich mittels Zelltransfer übertragen lässt, wahrscheinlich.

Durch Stimulation von Pd-spezifischen Memory-cells wird dann die positive PLK-Antwort in den unbehandelten Empfängertieren ausgelöst. Ein anderes Erklärungsmodell für die positive Reaktion der unbehandelten Empfängertiere ist nicht naheliegend. Der genaue Mechanismus dieser T-Zell-Stimulation aber ist nicht bekannt. Naheliegend erscheinen ähnliche Mechanismen wie bei der PLK-Primärantwort.

Für $NiSO_4$ hingegen scheint der Mechanismus der T-Zell-Interaktion geklärt. ROMAGNOLI et al. [99] zeigten, dass die Affinität des Schwermetalls zu einer Modifikation eines Peptides der HLA-DR-Region dahingehend führte, dass die T-Zellen in der Lage waren, das veränderte Epitop zu erkennen. Es wurde nachgewiesen, dass

NiSO_4 keine direkte Bindung mit dem MHC-Klasse-II-Molekül eingeht, sondern den Komplex aus MHC-Molekül und Selbstpeptid derartig verändert, dass dieses von den spezifischen T_H -Zellen erkannt werden kann.

Analog dieser Theorie, könnten sich auch Pd-spezifische Immunreaktionen gegen veränderte MHC-Moleküle richten [100].

Passend erscheint auch hier wieder das pathogenetische Erklärungsmodell von BLOKSMA et al. [95]. ARTIK et al. konnten für Nickel alle drei oben erwähnten Mechanismen der Antigenpräsentation nachweisen [82].

Analog dem Ergebnis aus der PLK-Zweitantwort war es auch im Adoptiv-Transfer möglich, eine positive PLK-Antwort mit einem gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höheren PLK-Index, durch Restimulation mit einer suboptimalen Dosis eines Chloroplatinats zu erzeugen. Die Frage der Kreuzreaktivität kann allein aufgrund dieser Ergebnisse jedoch nicht abschließend beurteilt werden. Sie wird von einigen Autoren jedoch für wahrscheinlich gehalten [32, 58, 101, 102].

Kreuzreaktionen von Palladium mit anderen Metallen:

So zeigten PISTOOR et al. [101], dass humane Nickel-reaktive T-Zell-Klone ($\text{CD}3^+$, $\text{CD}4^+$, $\text{CD}8^-$) in-vitro in 6 von 20 Fällen mit PdCl_2 kreuzreagierten. 10/20 dieser Proben kreuzreagierten mit Kupfer. Die Autoren schlossen daraus, dass die Kreuzreaktivität damit auf klonalem Level liegt, d.h., dass die Metallionen die (Histidin-)Konformation an gleichen Peptidstellen der MHC-Moleküle ändern und somit eine gleiche Epitopbildung vorläge.

WAHLBERG & BOMAN [32] demonstrierten im „guinea pig maximization test“ (GPMT), dass Pd-sensibilisierte Meerschweinchen mit Nickel kreuzreagierten. Umgekehrt war es jedoch nicht möglich, die Nickel-sensibilisierten Tiere mit Palladium zu restimulieren. Die Schlußfolgerung der Autoren war, dass es sich sowohl um eine echte Palladium-Allergie handeln muß- somit eine Nickel-Kontamination der Pd-Patch-Test Proben ausgeschlossen werden kann- als auch, dass Palladium und Nickel kreuzreagieren.

Auch MOULON et al. [102] gelang es, mit Nickel-sensibilisierten PBMC-Proben (peripheral blood mononuclear cells) auf zellulärer Ebene eine echte Kreuzreaktion zwischen Nickel und Palladium in beiden Richtungen zu zeigen. Die Autoren halten die Benutzung gleicher MHC-Klasse-II-Elemente für ursächlich.

Auch SANTUCCI et al. [58] führen diese mögliche Kreuzreaktivität verschiedener Gruppe-VIII-Elemente, auf ähnlich geformte Komplexstrukturen zurück, die sich ihrerseits aus der chemischen Verwandtschaft mit meist gleicher Gruppenzugehörigkeit und gleichen oder ähnlichen Liganden ergeben.

Dagegen erklären AUGTHUN et al. [48] diese kombinierten Allergien mit dem häufig gemeinsamen Vorkommen in Metallwerkstoffen, die eine gleichzeitige Sensibilisierung ermöglichen. Dies würde jedoch auch nicht von einem verantwortlichem Umgang mit diesen hochpotenten Allergenen befreien.

Interessant in diesem Zusammenhang ist ebenfalls, dass Berichte über solitäre Palladium-Allergien eher selten sind. In zwei Fallberichten, konnte solch eine solitäre Palladium-Allergie aufgezeigt werden [37, 42].

In sechs klinischen Studien wurden ebenfalls solitäre Palladium-Allergien beobachtet, deren prozentualer Anteil sehr gering war. In drei Studien [48, 50, 52] wiesen nur 0,2 % der Patienten solitäre Palladium-Allergien auf, in einer Studie [64] lag der Anteil bei 0,4%, in einer weiteren [62] bei 0,5%. Den größten Anteil solitärer Palladium-Allergien zeigte ABERER [54] bei 1383 Ekzempatienten auf. Hier wurden 0,6 % solitäre Pd-Allergien ermittelt.

Sehr viel häufiger vorzufinden sind auch hier kombinierte Allergien. Die weitaus häufigste kombinierte Allergie findet sich mit Nickel. Der Anteil der mit Nickel kombinierten Palladium-Allergie hat einen Anteil von 93- 100% der nachgewiesenen Palladium-Allergien überhaupt [43].

Laut KRÄNKE & ABERER [63] ist bei bestehender Palladium-Allergie statistisch in 94,6% der Fälle, mit einer zusätzlichen Allergie gegen Nickel zu rechnen. Im umgekehrten Fall ist die Assoziation zwar weitaus geringer, aber dennoch beachtlich: in 33% der Fälle ist bei bestehender Nickel-Allergie zusätzlich mit einer Palladium-Allergie zu rechnen.

Führt man sich die Häufigkeit der Nickel-Allergie mit Bezug auf Pd-Kreuzreaktionen vor Augen, scheint Vorsicht geboten zu sein beim Einsatz von Palladium-haltigen Dentallegierungen. Einige Autoren verweisen aus diesem Grund darauf, dass zumindest bei bekannter Nickel-Allergie, vor dem Einsatz Palladium-haltiger Zahnersatzstoffe ein Patch-Test mit PdCl_2 durchzuführen sei, um unnötige Belastungen der betroffenen Patienten zu vermeiden [48, 52, 55].

Da bei Manifestation klinischer Beschwerden und folgender Entfernung der Pd-haltigen Zahnmaterialien, die Symptomatik meist vollständig abklingt, darf dies als weiteres Zeichen einer echten Hypersensibilisierung gegen Palladium angesehen werden [64].

Klinisch mit Platin kombinierte Palladium-Allergien konnten von SHEARD [34] und KOCH & BAUM [43] nachgewiesen werden.

Eine positive PLK-Antwort und damit experimentell ermittelte, fragliche Kreuzreaktivität von Platin und Palladium konnte, wie oben schon erwähnt, von PAGELS [98] im Adoptiv-Transfer-PLK-Test gezeigt werden.

Die Berücksichtigung dieser Ergebnisse macht einen Schwermetall-spezifischen, T-Zell-abhängigen Mechanismus um so wahrscheinlicher. Da kombinierte Allergien bzw. Kreuzreaktivität in unseren Ergebnissen besteht, ist auch ein ähnlicher Sensibilisierungsmechanismus bzw. eine ähnliche Epitopkonfiguration, die von den sensibilisierten T-Zellen erkannt wird, wahrscheinlich. (Die Metall-Ionen, hier die Palladium-Ionen, alleine, sind jedoch anscheinend nicht entscheidend für die Immunantwort).

Ein häufig angeführtes Erklärungsmodell für positive Patch-Test-Ergebnisse ist die Nickel-Kontamination der Patch-Test-Proben.

Um dies zu klären, ermittelten EEDY et al. eine Schwellendosis für positive Reaktionen auf Nickel im Patch-Test. Sie testeten 9 Konzentrationen von NiSO_4 5% pet. in Konzentrationen von 20 mg/ml bis 50 µg/ ml an 20 Ni-positiven Probanden.

Es wurden Finn chambers für zwei Tage aufgelegt. Am dritten Tag erfolgte die Ablesung. Bei einer Dosis von 1mg/ ml (= 0,1%) ermittelten sie bei keinem der 20 Nickel-sensibilisierten Probanden einen positiven Patch-Test.

Nachfolgend wurden verschiedene Metallsalzverbindungen, u.a. Palladium, aus drei verschiedenen Patch-Test-Herstellererien auf ihren Nickelgehalt hin mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie untersucht. Die Nickel-Verunreinigungen der Proben waren deutlich geringer als die ermittelte Dosis, die bei Nickelallergiker eine positive Reaktion hervorrufen würde.

Daraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden, dass sich zumindest der Großteil der positiven Patch-Test-Ergebnisse auf Palladium nicht durch die Nickel-Kontamination der Proben erklären läßt.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden in vielen Studien vor der Testdurchführung, die Palladiumproben auf ihren Nickel-Gehalt hin untersucht und als Ursache falsch-positiver Ergebnisse ausgeschlossen [44, 45, 49, 50, 57].

Um die Übertragbarkeit der immunogenen Wirkung von Palladium im Mausmodell auf die humane Situation zu bekräftigen, führten KULIG et al. [103] den Lymphozyten-Transformations-Test (LTT) mit Proben von im Patch-Test auf PdCl_2 positiven Probanden durch. Es wurde die in-vitro Lymphozyten-Reaktivität von 6 Probanden ausgetestet, die im Patch-Test auf PdCl_2 1% positiv reagierte, jedoch keine gleichzeitig bestehende Nickel-Sensibilisierung aufwiesen.

Es zeigte sich, dass in 4/6 Fällen die Lymphozyten durch die Inkubation mit Palladium eine Stimulation der Proliferationsrate erfuhren, d. h. es wurde eine signifikant gesteigerte Erhöhung des ^3H -Thymidin-Einbaus beobachtet. Die Inkubation mit NiSO_4 und $\text{Na}_2[\text{PtCl}_6]$ brachte keine vergleichbaren Ergebnisse hervor.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass Chloropalladate als Haptene agieren, und kompetent sind, auch im Menschen eine T-Zell-abhängige Immunantwort auszulösen.

5.2 Induktion einer kontaktallergischen Reaktion in Mäusen durch topische Applikation von $K_2[PdCl_4]$ mit dem Aurikulären-Lymphknoten-Test

Da das klinische Erscheinungsbild einer Palladium-Allergie meist in Form einer Kontaktdermatitis auftritt, gilt den Ergebnissen des ALK-Testes besonderes Interesse. Im Mausmodell sollte durch topische Behandlung des Mausinzuchtstammes BALB/c mit $K_2[PdCl_4]$ die mögliche Induktion einer Kontaktallergie überprüft werden.

Analog dem PLK-Test wird das Ergebnis, durch Ermittlung der Zellzahl der drainierenden Lymphknoten, hier also der aurikulären Lymphknoten, ermittelt [76, 77].

Die Induktionsphase der von GAD [80] beschriebenen Version, wurde in dieser Arbeit dahingehend verändert, dass kein Adjuvans verabreicht wurde. Dies geschieht analog zum Versuchsaufbau von LERCHENMÜLLER [75].

Nach einem viertägigen Behandlungsmodus mit nachfolgend eintägigem, behandlungsfreien Intervall, zeigten sich signifikante ALK-Indizes bei den Gruppen, die mit einer 4%-igen, 2%-igen und einer 1%-igen Lösung behandelt waren. Diese Zellproliferation in den drainierenden aurikulären Lymphknoten ist Ausdruck der Induktion einer Kontaktallergie [76]. Dies demonstrierte KIMBER [77] mit Zellproben des ALK-Testes mittels des 3H -Thymidin-Einbaus, der eine Zunahme der Proliferationsrate anzeigt.

Nach BLOKSMA [95] legt dies einen Pd-spezifische, T-Zell-abhängigen Mechanismus, der dem ALK-Test zugrunde liegt, sehr nahe.

In einem zweiten ALK-Experiment, dass die Kinetik der Reaktion untersuchen sollte, wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Es folgte die erste Auswertung am Tag 6 (5d Behandlung/1 d Pause; ALK-Index: 2,9) des Experimentes, die zweite am Tag 8 (5 d Behandlung/ 3 d Pause; ALK-Index: 3,1) des Experimentes und die letzte Auswertung am Tag 10 (5 d Behandlung/ 5 d Pause; ALK-Index: 2,65) des Experimentes.

Alle ALK-Indizes waren an den entsprechenden Tagen signifikant. Es zeigte sich aber, dass die deutlichste Antwort auf die applizierte Palladiumlösung am zweiten

Auswertungstag auftrat, d. h. nach einer dreitägigen Pause. Hingegen zeigte die dritte Auswertung nach 5 Tagen Pause schon eine deutliche Reduktion der Immunantwort, die bis unter den Wert der ersten Auswertung fiel.

Die Kinetik der positiven PLK-Antwort zeigt einen hiervon divergierenden Verlauf. Dort sind die ersten signifikanten PLK-Indizes ab Tag 4-5 zu erwarten, die dann mindestens für 10 Tage nachweisbar bleiben [95].

Dies erklärt sich wahrscheinlich schon alleine aus dem sehr unterschiedlichen Behandlungsmodus. Die Behandlungsdauer des ALK-Testes ist um ein Vielfaches länger. Trotzdem ist nicht sicher, ob die absolute, dem Immunsystem zur Verfügung stehende Dosis des Antigens nicht geringer ist als im PLK-Test, wo das Antigen direkt im Organismus und damit am Wirkort appliziert wird.

Eine weitere mögliche Erklärung für die vergleichsweise niedrigen ALK-Indizes und das schnelle Abklingen der Immunantwort könnte, anders als im PLK-Test, die „Low-responder“-Eigenschaft des BALB/c-Mausstammes im ALK-Test sein. In Epikutansensibilisierungs-Experimenten zeigte ISHII [104] für einige Verbindungen eine genetische Kontrolle der Typ IV-Immunantwort, die durch ein Immunresponse-Gen ausgeübt wird. Dieses Gen liegt innerhalb der I-A Region des H-2 Komplexes der Maus.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die positiven PLK- und ALK-Antworten genetisch kontrolliert sind. Für die Chloroplatinate schließt SCHUPPE [74] sich dieser Vorstellung an. Dort zeigte sich eine unterschiedliche Reaktivität von BALB/c- und DBA/2-Mäusen gegen Platinverbindungen im PLK-Test.

Diese Beobachtung wurde auch in anderen vorangehenden Studien gemacht, die demonstrieren konnten, dass das Ausmaß bzw. die Größe der PLK-Antwort auf niedermolekulare Verbindungen, sowohl von MHC-Loci, als auch von nicht MHC-Genloci beeinflusst wird. Für Diphenylhydantoin [72], D-Penicillamin [68] und HgCl_2 [70] wurde dort ebenfalls ein unterschiedliches Ansprechen der Mausstämme BALB/c und DBA/2 beobachtet.

Gelegentlich werden falsch-negative Ergebnisse im ALK-Test beobachtet, deren mögliche Ursache beim verwendeten Lösungsmittel liegen kann. So konnte KIMBER [76] mit Kaliumdichromat und Nickelsulfat und Wasser als Lösungsmittel, im ALK-Test keine erhöhten ALK-Indizes erzielen. Unter Verwendung von 25% Ethanol gelang es GAD [80] aber, mit beiden Substanzen im Mouse-Ear-Swelling-Test (MEST), die Auslösbarkeit kontaktallergische Reaktionen zu demonstrieren.

Somit könnte auch die Höhe der Indizes vom verwendeten Lösungsmittel abhängig sein. So sind im PLK-Test schon 45 nmol verschiedener Palladiumverbindungen oder weniger ausreichend, um einen vergleichbaren Index zu erzielen, wie er mit einer 2%-igen (20 mg/ ml) Lösung von $K_2[PdCl_4]$ im ALK-Test gezeigt werden konnte. Sicherlich liegt eine Ursache der niedrigeren ALK-Indizes im Applikationsmodus selbst. Während beim PLK-Test das Hapten direkt im Organismus appliziert wird, gleich von Antigen-präsentierenden-Zellen identifiziert werden kann und somit die T-Zell-abhängige Reaktion unmittelbar nach Applikation ablaufen kann, ist beim ALK-Test die Haut mit ihrer physiologischen Barrierefunktion ein zu überwindendes Hindernis. Es muß zunächst die Penetration der Epidermis erfolgen, damit eine Interaktion zwischen Hapten und den Langerhans-Zellen möglich ist. Nachfolgend muß die Langerhans-Zelle den drainierenden Lymphknoten erreichen, um dort die T-Zell-abhängige Reaktion auf Palladium zu induzieren.

Nach TSE [105] und SCHULER [106] ist es wahrscheinlich, dass die Pd-Komplexverbindung als Hapten zur Modifikation von intrazellulären Proteinen führt, oder aber, an der Zelloberfläche von z.B. Langerhans-Zellen exprimierte Proteine verändert, die nach Migration dieser Zellen in die regionären Lymphknoten [107] zusammen mit MHC-II-Molekülen T-Zellen präsentiert werden können [108]. Für die Verbindung Trinitrochlorbenzol (TNCB) konnte dies von HAUSER [109] gezeigt werden.

Als Standardtest zum Nachweis der Zweitantwort von Kontaktallergien führten wir den Mouse-Ear-Swelling-Test (MEST) durch und demonstrierten so die Auslösephase der Kontaktsensibilisierung durch $K_2[PdCl_4]$. GAD [80] untersuchte mittels dieser Methode eine Reihe von Kontaktallergenen. Dabei stellte sich der MEST, als sensitives und spezifisches in-vivo-Testsystem zur Identifikation vermuteter Kontaktallergene, heraus.

Durch einseitige topische Applikation wird eine Kontaktallergie ausgelöst, deren Auslösephase nach einem behandlungsfreien Intervall und nach erfolgter Restimulation des unbehandelten Ohres durch Messung der induzierten Ohrschwellung quantifiziert wird.

Obwohl sich nach fünftägiger Behandlung von BALB/c-Mäusen mit 2% $K_2[PdCl_4]$ signifikante Unterschiede der Ohrdicken nach 24, 48 und 72 Stunden nachweisen ließen, erschien das Ergebnis der prozentualen Ohrdickenzunahme zur sicheren Demonstration der Auslösephase einer Kontaktsensibilisierung zu gering. Es zeigte sich am 1. Tag eine 11%-ige Ohrdickenzunahme, am 2. Tag war eine Ohrdickenzunahme von 8% meßbar, am 3. Tag sank die Schwellung auf 6% ab. Verglichen mit Ohrdickenzunahmen des potenten Allergens Oxazolone, dessen 1%-ige Lösungen eine Ohrdickenzunahme von bis zu 70% induzieren, erschienen die Ergebnisse nicht ausreichend different, obgleich sich hier eine mögliche Reaktion andeuten ließ.

Diese unzureichende Auslösbarkeit im MEST wurde insbesondere auf die problematische Lösbarkeit der Palladiumverbindungen zurückgeführt. Trotz Einsatzes unterschiedlichster Lösungsmittel (DMSO, DMF, Azeton, Ethanol, DAE), die in unterschiedlichen Dosierungen und Mischungsverhältnissen mit NaCl 0,9% experimentell erprobt wurden, gelang es uns nicht, höhere Konzentrationen als die benutzte 2%-ige Lösung mit DAE herzustellen. Um aber suffiziente Kontaktsensibilisierungen mit niedermolekularen Verbindungen erzeugen zu können, sind meist höhere Konzentrationen der zu testenden Substanz, notwendig. So verwendete z.B. LERCHENMÜLLER [75] eine 5%-ige Chloroplatinat-Lösung, um deren kontaktsensibilisierendes Potential im MEST zu demonstrieren.

Ein weiterer Grund könnte, wie schon oben diskutiert, die „Low-responder“-Eigenschaft der BALB/c-Mäuse in diesen Kontaktsensibilisierungs-Experimenten sein, obwohl sie sich im PLK-Test als „High-responder“-Stamm darstellten.

Eine andere Möglichkeit wäre eine häufiger diskutierte Toleranz der Mäuse gegenüber Nickelverbindungen. Käme es hier zu einer denkbaren Kreuzreaktion zwischen Nickel und Palladium, so wäre eine Sensibilisierung der Mäuse mit Palladium nicht möglich.

Letztlich aber bleibt unklar, aus welchem Grund sich im MEST keine deutlicheren Ergebnisse demonstrieren ließen.

Ein anderes Ergebnis, dass die Theorie der T-Zell-abhängigen Kontaktsensibilisierung im ALK-Test bestätigt, sind immunhistochemische Untersuchungen der ALK-Antwort von KULIG [110]. Im ALK-Test positive Proben von mit $K_2[PdCl_4]$ behandelten BALB/c-Mäusen wurden dort mittels FACS-Analysen (Fluoreszenzaktivierter Zellsorter) untersucht. Dort zeigte sich, dass der Anteil der proliferierenden Zellen in der Lymphknoten-Zellsuspension der ALK-Antwort, im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrollgruppe um das 12-fache angestiegen war, was wiederum die Pd-spezifische, T-Zell-abhängige Immunantwort in diesem Kontaktsensibilisierungs-Experiment demonstriert.

5.3 Zusammenfassung

In jüngerer Zeit häufen sich die Fallberichte und klinischen Studien bezüglich der Sensibilisierungsraten verschiedener Chloropalladate. In der Normalbevölkerung konnte eine Sensibilisierungsrate von 7% auf Palladium ermittelt werden .

Die Sensibilisierung auf Palladium äußert sich als Typ IV-Reaktion, d. h. als Kontaktdermatitis, -mukositis, oder seltener als oraler Lichen planus, seltener als Typ I-Reaktion. Aufgrund des häufigen Vorkommens von Palladiumverbindungen in Dentallegierungen, Katalysatoren und in der Schmuckindustrie ist die Untersuchung der zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen von großer Bedeutung.

Ziel dieser Studie war es deshalb das immunogenen Potential der Palladiumverbindungen $K_2[PdCl_4]$, $(NH_4)_2[PdCl_6]$, $PdCl_2$, Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 in Experimenten mit BALB/c-, C57Bl/6- und NMRI-Mäusen zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass schon einmalige s.c. Injektionen von Dosierungen im nmol-Bereich (45-180 nmol) ausreichend waren, um eine dosisabhängige, primäre Immunantwort im PLK-Test, auszulösen. Um eine Sensibilisierung gegen Palladiumverbindungen nachzuweisen, wurden die Mäuse chronisch nasal und damit physiologisch mit $(NH_4)_2[PdCl_6]$ belastet. Es konnte eine systemische, Pd-spezifische, T-Zell-abhängige Reaktion in der PLK-Zweitantwort am gleichen Tier demonstriert werden. Zusätzlich konnte im Adoptiv-Transfer-PLK-Test nach 11-wöchiger nasaler Belastung (3,6 nmol/ 25 μ l) mit $(NH_4)_2[PdCl_6]$ und $K_2[PdCl_4]$, durch den Transfer von Milzzellen in syngene, unbehandelte Geschwistertiere die systemische, Pd-spezifische, zelluläre Immunantwort demonstriert werden. In diesen Experimenten zeigte sich eine Kreuzreaktivität mit Chloroplatinaten. Neben der nasalen und subkutanen Applikation konnte auch durch topische Gabe von $K_2[PdCl_4]$ eine Sensibilisierung erreicht werden. Es wurde eine Pd-spezifische, kontaktallergische Reaktion induziert, die sich durch den ALK-Test quantifizieren ließ.

In dieser Dissertation wurde erstmals gezeigt, dass Chloropalladate im Mausmodell über ein erhebliches T-Zell-sensibilisierendes Potential verfügen. Inwieweit diese Ergebnisse auf das humane System übertragbar sind, und welche zellulären Mechanismen dem zugrunde liegen bleibt die Aufgabe zukünftiger Studien.

6. Literaturverzeichnis

- [1] CHARLES E. MORTIMER : Chemie. Das Basiswissen der Chemie. 5. Auflage. - Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- [2] JUTTA BEGEROW & L. DUNEMANN: Bedeutung und Analytik von Edelmetallen. IN: Umwelthygiene, Jahresbericht 1994/95 : Berichte aus den einzelnen Forschungsgebieten, Hrsg.: Gesellschaft zur Förderung der Lufthygiene und Silikoseforschung e.V. Düsseldorf, Band.27; Seite 201-232.
- [2a] BUNDESGESUNDHEITSAMT-PRESSEDIENST: Bundesgesundheitsamt zu Dentallegierungen. Mitteilung Nr. 21 vom 04.05.1993.
Zitiert nach [2]
- [3] FALBE, J. und M .REGITZ (Hrsg.): Römpp Chemie Lexikon. Bd. 1-6, 9. Auflage- Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1989-1992.
- [4] HENNE,A.; G.A. WIESMÜLLER & G. LENG:2.1.12 Palladium.
In: Handbuch der Arbeitsmedizin: Arbeitsphysiologie, Arbeitspathologie, Prävention. Hrsg. L. Konietzko und H. Dupuis.- Landsberg / Lech: Ecomed Verlag 1989, 12. Erg.-Lfg. 11/94,, S. 1-20.
- [5] HANS-DIETER JAKUBKE, HANS JESCHKEIT: Fachlexikon abc Chemie in 2 Bänden, 2. und 3. Auflage, Verlag Hari Deutsch, Thun und Frankfurt Main.
- [6] GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN- UND UMWELTFORSCHUNG mbH Neuherberg/ Forschungszentrum Jülich GmbH: Zwischenbericht „Edelmetall-emissionen“.- München:GSF 1990.
- [7] HOHMANN, W.: Was sind Palladiumbasisstoffe? Welche Legierungen sind empfehlenswert?; Zahnärztl. Mitt. 76 (1986) 909-912.
- [8] PHIELEPEIT, T. und W. LEGRUM: Zur Toxizität des Palladiums. Dtsch. Zahnärztl. Z. 41 (1986) 1257-1260.
- [9] BRIGITTA KÜTTING & RANDOLF BREHLER: Klinisch relevante solitäre Palladiumallergie. Hautarzt (1994),45:176-178

- [10] G. A. WIESMÜLLER: Gesundheitliche Auswirkungen von Palladium, Berichte aus den einzelnen Forschungsgebieten, In: Umwelthygiene, Jahresbericht 1994/95, Band 27, Seite 232-255, Hrsg.: Gesellschaft zur Förderung der Lufthygiene und Silikoseforschung e.V. Düsseldorf.
- [11] GOERING, P.L.: Platinum and related metals: Palladium, iridium, osmium, rhodium and ruthenium. In: Hazardous Materials Toxicology. Clinical Principles of Environmental Health. Hrsg. J.B. Sullivan und G.R. Krieger.- Baltimore u.a.: Williams & Wilkins 1992, S. 874-881.
Zitiert nach G. A. WIESMÜLLER[10]
- [12] VENUGOPAL, B. & T.D. LUCKEY(Hrsg.): Metal toxicity in mammals 2. Chemical toxicity of metals and metalloids.- New York, London: Plenum Press 1978.
Zitiert nach G. A. WIESMÜLLER [10]
- [13] WATAHA, J.C. & HANKS, C.T.: Biological effects of palladium and risk of using palladium in dental casting alloys (1996), IN: Journal of oral rehabilitation, 23, 309-320.
- [14] RAU, T. und VAN ELDIK, R.: Mechanistic insight from kinetic studies on the interaction of model palladium(II)complexes with nucleic acid components. In: Metal Ions in Biological Systems:1996,32:339-78.
- [15] MOORE, W.; HYSELL, D.; HALL, L.; CAMPBELL, K. & STARA, J. (1975): Preliminary studies on the toxicity and metabolism of palladium and platinum. IN: Environmental Health Perspectives, 10, 63.
Zitiert nach [10].
- [16] HOLBROOK, D. J.; WASHINGTON, M.E.; LEAKE, H. B. & BRUBAKER, P.E., (1975): Studies on the evaluation of the toxicity of various salts of lead, manganese, platinum and palladium. IN: Environmental Health Perspectives, 10,95.
Zitiert nach [13].

- [17] WIESTER, M.J.: Cardiovascular actions of palladium compounds in the unanesthetized rat. IN: Environmental Health Perspectives 12 (1975), 41-44. Zitiert nach [10] und [13].
- [18] ORESTANO, G.: The pharmacologic action of palladium chloride. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 8 (1933) 1154 - 1156. Zitiert nach [10].
- [19] MOORE, W.; HYSELL, D.; HALL, L.; CAMPBELL, K. & STARA, J. (1974): Biological fate of ^{103}Pd in rats following different routes of exposure. IN: Environmental Research, 8, 234. Zitiert nach [13].
- [20] HOLBROOK, Jr. D. J. et al: Effects of platinum and palladium salts on parameters of drug metabolism in rat liver. IN: J. Toxicol. Environ. Health 1 (1976) 1067-1079, zitiert nach [10].
- [21] FISHER, R. F.; HOLBROOK, D. J.; LEAKE, H.B. & BRUBAKER, P.E. (1975): Effects of palladium and platinum salts on thymidine incorporation into DNA of rat tissues. IN: Environmental Health Perspectives, 12,57. Zitiert nach [13].
- [22] SCHROEDER, H.A. und MITCHNER, M.: Scandium, chromium (IV), gallium, yttrium, rhodium, palladium, indium in mice: Effects on growth and life span. IN: J. Nutr. 101 (1971), 1431 - 1438. Zitiert nach [10].
- [23] PHIELEPEIT, T.; LEGRUM, W.; NETTER, K. J. und KLÖTZER, W. T.: Different effects of intraperitoneally and orally administered palladium chloride on the hepatic monooxygenase system of male mice. (1989) IN: Arch. Toxicol. Suppl. 13, 357-362.
- [24] RAPAKA, R.S.; SORENSEN, K.R.; LEE, S. D. & BHATNAGAR, R.S. (1976): Inhibition of hydroxyproline synthesis by palladium ions. IN: Biochemica et Biophysica Acta, 429,63. Zitiert nach [13].
- 25] SPIKES, J.D. & HODGSON, C.F. (1969): Enzyme inhibition by palladium chloride. IN: Biochemical and Biophysical Research Communications, 35, 420. Zitiert nach [13].
- [26] TAUBLER, J.: Allergic response to platinum and palladium complexes

- determination of no-effect level. IN: US NTIS PB Rep. ISS PB- 271659 (1977).
Zitiert nach [10].
- [27] TOMILETS, V.A.; DONTSOV, V.I. & ZAKHAROVA, I.A.: Immediate and delayed allergic reactions to group VIII metal salts in the experiment. IN: Fiziol. Z. 25(1979), 653-657, zitiert nach [10].
- [28] TOMILETS, V.A. & ZAKHAROVA, I.A.: Anaphylactic and anaphylactoid properties of complex palladium compounds. IN: Russian Pharmacol. and Toxic., 1979, vol 42, Nr. 2, 62-67.
- [29] BOMAN, A. & WAHLBERG, J.E.: Experimental sensitization with palladium chloride in the guinea pig. IN: Contact Dermatitis 23 (1990),256.
Zitiert nach [10].
- [30] MAGNUSSON, B. & KLIGMAN, A.: Allergic contact dermatitis in the guinea pig. IN: Identifications of contact allergens.-Springfield, IL, USA: Thomas (1970). Zitiert nach [10].
- [31] WAHLBERG, J.E. & BOMAN, A.: Palladium chloride - A potent sensitizer in the guinea pig. IN: Am. J. Contact Dermatitis1 (1990),112-113.
Zitiert nach [10].
- [32] WAHLBERG, J.E. & BOMAN, A.S.: Cross-reactivity to palladium and nickel studied in the guinea pig (1992). IN: Acta Derm Venereol (Stockh), 72,95-97.
- [33] KAUFFMANN, M.: Über ein neues Entfettungsmittel; kolloidales Palladiumhydroxydul („Leptynol“). IN: Münch. Med. Wschr. 60 (1913)525-527.
Zitiert nach [10].
- [34] SHEARD, C.: Contact dermatitis from platinum and related metals (1955). IN: Archives of Dermatology, 1955:71:357-60.
- [35] MUNRO-ASHMAN, D; MUNRO, D. D.& HUGHES, T.H. (1969): Contact dermatitis from palladium. IN: Transactions of the St. John´s Hospital Dermatological society, 55, 196. Zitiert nach CRONIN Etain: Contact dermatitis, Metals:279-390, Hrsg. Churchill Livingstone , 1. Auflage, 1980.
- [36] VAN KETEL, W.G. & NIEBBER, C.: Allergy to palladium in dental alloys. IN: Contact dermatitis 1981: 7: 331-357.

- [37] CASTELAIN, P.Y. & CASTELAIN, M.: Contact dermatitis to palladium.
IN: Contact dermatitis (1987): Jan., 16 (1):46.
- [38] GUERRA, L.; MISCIALI, C.; BORRELLO, B. & MELINO, M.: Sensitization to palladium. IN: Contact dermatitis, 1988, Oct., 19 (4):306-7.
- [39] DOWNEY, D.:Contact mucositis due to palladium. IN: Contact dermatitis 21(1989) 54. Zitiert nach [10].
- [40] VAN JOOST, Th. & ROESYANTO-MAHADI, I.D.: Combined sensitization to palladium and nickel. IN: Contact dermatitis 1990: 22: 227-228.
- [41] HACKEL, H.; MILLER, K.; ELSNER, P. & BURG, G.: Unusual combined sensitization to palladium and other metals.
IN: Contact dermatitis 1991: 24: 131- 132.
- [42] KÜTTING, B. & BREHLER, R.: Klinisch relevante solitäre Palladiumallergie
IN: Hautarzt (1994) 45: 176- 178.
- [43] KOCH, P. & BAUM, H.P.:Contact stomatitis due to palladium and platinum in dental alloy. IN: Contact dermatitis, 1996, 34, 253- 257.
- [44] VAN LOON, L.A.J.; VAN ELSAS, P.W.; VAN JOOST, TH. & DAVIDSON, C.L.:
Contact stomatitis and dermatitis to nickel and palladium.
IN: Contact dermatitis 1984: 11: 294-297.
- [45] VAN LOON, L.A.J.; VAN ELSAS, P.W.; VAN JOOST, TH. & DAVIDSON, C.L.:
Test battery for metal allergy in dentistry.
IN: Contact dermatitis 1986: 14: 158-161.
- [46] MURDOCH, R.D. & PEPYS, J.: Platinum group metal sensitivity: reactivity to platinum group metal salts in platinum halide salt sensitive workers
IN: Annals of Allergy (1987), 59, 464.
- [47] CAMARASA, J.G.; SERRA-BALDRICH, E.; LLUCH, M.; MALET, A.; & GARCIA CALDERON, P.: Recent unexplained patch test reactions to palladium. IN: Contact dermatitis 1989: 20: 388.
- [48] AUGTHUN, M.; LICHTENSTEIN, M. & KAMMERER, G.: Untersuchungen zur allergenen Potenz von Palladium-Legierungen.
IN: Deutsche zahnärztliche Zeitschrift, 1990, 45, 480-482.

- [49] REBANDEL, P. & RUDZKI E.: Allergy to palladium
IN: Contact dermatitis (1990), 23, 121-122.
- [50] CAMARASA, J.G.; BURROWS, D.; MENNÉ, T.; WILKINSON, D. & SHAW, S.:
Palladium contact sensitivity. IN: Contact dermatitis (1991): 24: 370.
- [51] TODD, D.J. & BURROWS, D.: Patch testing with pure palladium metal in
patients with sensitivity to palladium chloride.
IN: Contact Dermatitis (1992): 26: 327-331.
- [52] DE FINE OLIVARIUS, F.& MENNÉ, T.: Contact dermatitis from metallic palladium
in patients reacting to palladium chloride.
IN: Contact Dermatitis (1992): 27: 71-73.
- [53] SCHWICKERATH, H. & MERK, F.: Reaktionen auf Palladiumlegierungen im
Epikutantest. IN: ZWR, 102. Jahrg., 1993, Nr. 12; 866-867.
- [54] ABERER, W.; HOLUB, H.; STROHAL, R. & SLAVICEK, R.: Palladium in dental
alloys- the dermatologist's responsibility to warn?
IN: Contact Dermatitis (1993): 28: 163-165.
- [55] VILAPLANA, J.; ROMAGUERA, C. & CORNELLANA, F.: Contact dermatitis
and adverse oral mucous membrane reactions related to the use of dental
protheses. IN: Contact Dermatitis (1994): 30: 80-84.
- [56] RUDZKI, E. & PRYSTUPA, K.: Sensitivity to various nickel and chromium
concentrations in patch test and oral challenge tests.
IN: Contact Dermatitis (1994): 30: 254.
- [57] VINCENZI, C.; TOSTI, A.; GUERRA, L.; KOKELJ, F.; NOBILE, C.; RIVARA, C.
& ZANGRANDO E.: Contact dermatitis to palladium: a study of 2300 patients.
IN: American Journal of Contact Dermatitis, Vol 6, No 2 (June), 1995: 110-112.
- [58] SANTUCCI, B.; CRISTAUDO, A; CANNISTRACI, C.& PICARDO, M.:
Interaction of palladium ions with the skin. IN: Exp. Dermatol.1995: 4: 207-210.
- [59] KOCH, P. & BAHMER, F.A.: Oral lichenoid lesions, mercury hypersensitivity
and combined hypersensitivity to mercury and other metals: histologically-
proven reproduction of the reaction by patch testing with metal salts.
IN: Contact Dermatitis, 1995, 33, 323-328.

- [60] UTER, W.; FUCHS, Th.; HÄUSSER, M. & IPPEN, H.: Patch test results with serial dilutions of nickel sulfate (with and without detergent), palladium chloride, and nickel and palladium metal plates. IN: Contact Dermatitis, 1995, 32, 135-142
- [61] SCHÜRER, N.Y.; ZELLER, G. & GOERZ, G.: Epikutantestung von Zahnprothesenmaterialien. IN: Dermatosen, 43, Heft 1(1995), 22-25.
- [62] MARCUSSON, J.A.: Contact allergies to nickel sulfate, gold sodium thiosulfate and palladium chloride in patients claiming side-effects from dental alloy components. IN: Contact Dermatitis, 1996, 34, 320-323.
- [63] KRÄNKE, B. & ABERER, W.: Multiple sensitivities to metals. IN: Contact Dermatitis 1996: 34: 225.
- [64] KANERVA, L.; KEROSUO, H.; KULLAA, A. & KEROSUO, E.: Allergic patch test reactions to palladium chloride in schoolchildren. IN: Contact Dermatitis, 1996, 34, 39-42.
- [65] NAKAYAMA, H.: Hypersensitivity to palladium is linked to oral lichen planus. IN: Dermatology News, Feb. 1982; zitiert nach [50].
- [66] BIAGINI, R.E.; BERNSTEIN, L; GALLAGHER, J.S.; MOOREMAN, W.J.; BROOKS, S. & GANN, P.H.: The diversity of reaginic immune responses to platinum and palladium metallic salts. IN: J. Allergy Clin. Immunol. 76:794-802; 1985.
- [67] GLEICHMANN, H.: Studies on the mechanism of drug sensitization; T-cell-dependent Popliteal Lymph Node reaction to diphenylhydantoin. IN: Clinical Immunology and Immunopathology 18, 203-211(1981).
- [68] HURTENBACH, U.; GLEICHMANN, H.; NAGATA, N. & GLEICHMANN, E.: Immunity to D-Penicillamine: Genetic, cellular and chemical requirements for induction of popliteal lymph node enlargement in the mouse. IN: The journal of immunology, Vol. 139, 411- 416, No2. July 15, 1987.
- [69] KLINKHAMMER, C.; POPOWA, P. & GLEICHMANN H.: Specific immunity to streptozocin. Cellular requirements for induction of lymphoproliferation. IN: DIABETES, Vol. 37, JANUARY 1988.

- [70] STILLER-WINKLER, R.; RADASZKIEWICZ, T. & GLEICHMANN, E.: Immunopathological signs in mice treated with mercury compounds- I. Identification by the popliteal lymph node assay of responder and nonresponder strains. IN: *Int. J. Immunopharmac.*, Vol 10, No. 4, 475-484, 1988.
- [71] GLEICHMANN, E.; VOHR, H.W.; STRINGER, C.; NUYENS, J. & GLEICHMANN, H.: Testing the sensitization of T-cells to chemicals. From murine graft-versus-host reactions (GvHRs) to chemical-induced GvH-like immunological diseases. IN: Kammüller, M.E.; Bloksma, N.; Seinen, W. (eds): *Autoimmunity and toxicology. Immunodysregulation induced by drugs and chemicals*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1989, pp 363-390.
- [72] KAMMÜLLER, M.E.; THOMAS, C.; DE BAKKER, J.M.; BLOKSMA, N. & SEINEN, W.: The popliteal lymph node assay in mice to screen for the immune disregulating potential of chemicals- A preliminary study. IN: *Int. J. Immunopharmac.*, Vol 11, No. 3, pp 293-300. 1989.
- [73] SCHUHMANN, D.; KUBICKA-MURANNYI, M.; MIRTSCHEWA, J.; GÜNTHER, J.; KIND, P. & GLEICHMANN, E.: Adverse immune reactions to gold. I. Chronic treatment with an Au(I) drug sensitizes mouse T-cells not to Au(I), but to Au(III) and induces autoantibody formation. IN: *J. of Immunology*, Vol. 145, 2132-2139, No. 7, Oct. 1, 1990.
- [74] SCHUPPE, H.C.; HAAS-RAIDA, D.; KULIG, J.; BÖHMER, U.; GLEICHMANN, E. & KIND, P.: T-cell-dependent popliteal lymph node reactions to platinum compounds in mice. IN: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1992, 97: 308-314.
- [75] LERCHENMÜLLER, C.: Auslösung primärer und sekundärer Immunantworten durch Chloroplatinate bei der Maus. Dissertation, Universität Düsseldorf, Dermatologische Klinik, 1995.
- [76] KIMBER, I. & WEISENBERGER, C.: A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. IN: *Arch. Toxicol.*, 1989, 63: 274-282.

- [77] KIMBER, I.; HILTON, J. & BOTHAM, P.A.: Identification of contact allergens using the murine local lymph node assay: comparisons with the Buehler occluded patch test in guinea pigs. IN: J. Appl. Toxicol., 1990, 10: 173-180.
- [78] BOEHMER VON H.: Separation of T- and B-lymphocytes and their role in the mixed lymphocyte reaction. IN: J. Immunol. (1974), 112: 70.
- [79] GOODMAN, M.G. & WEIGLE, W.O.: Nonspecific activation of murine lymphocytes. IN: Cell. Immunol. (1981), 65: 337.
- [80] GAD, S.C.; DUNN, B.J.; DOBBS, D.W.; REILLY, C & WALSH, R.D.: Development and validation of an alternative dermal sensitization test: The mouse ear swelling test (MEST).
IN: Toxicol. Appl. Pharmacol., 1986, 84: 93-114.
- [81] DE SOUSA, M.A.B. & PARROTT, D.M.V.: Induction and recall in contact sensitivity, changes in skin and draining lymph nodes of intact and thymectomized mice.
IN: J. Exp. Med. 1969, 130: 671-686.
- [82] ARTIK S., VON VULTEE C., GLEICHMANN E., SCHWARZ T., GRIEM P.: Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states.
IN: Journal of Immunology 1999, 163(3):1143-1152.
- [83] DEARMAN, R.J. & KIMBER, I.: Differential stimulation of immune function by respiratory and contact chemicals allergens.
IN: Immunology, 1991, 72: 563-570.
- [84] GLEICHMANN, H.; PALS, S.T. & RADASZKIEWICZ, T.: The T-cell-dependent B-cell-proliferation and activation induced by administration of the drug DPH to mice.
IN: Hematol. Oncol., 1983, 1: 165-176.
- [85] GLEICHMANN, E.; ROLINK, A.G.; PALS, S.T. & GLEICHMANN, H.: Graft-versus-host reactions (GvHRs): Clues to the pathogenesis of a broad spectrum of immunologic diseases.
IN: Transplant. Proc., 1983, 15: 1436-1440.
- [86] DE BAKKER, J.M.; KAMMÜLLER, M.E.; MULLER, E.S.M.; LAM, A.W.; SEINEN, W. & BLOKSMA, N.: Kinetics and morphology of chemically induced popliteal

- lymph node reactions compared with antigen-, mitogen- and graft-versus-host-reaction-induced responses.
IN: Virchows Archiv B Cell Pathol.; 1990, 58:279-287.
- [87] MUROCH, R.D.; PEPYS, J. & HUGHES, E.G.: IgE antibody responses to platinum group metals: a large scale refinery survey.
IN: British J. of Industrial Med., 1986, 43: 37-43.
- [88] NIELSON, K.B., ATKIN, C.L. & WINGE, D.R.: Distinct metal-binding configurations in metallothionein.
IN: J. Biol. Chem., 1985, 260: 5342-5350. Zitiert nach T. PHIELEPEIT et al.: Different effects of intraperitoneally and orally administered palladium chloride on the hepatic monooxygenase system of male mice.
IN: Arch. Toxicol. 1989; 13: 357-362.
- [89] FREEDMAN, S.O. & KRUPPEY, J.: Respiratory allergy caused by platinum salts.
IN: J. Allergy, 1968, 42: 233-237.
- [90] SCHULZE-WERNINGHAUS, G.; MERGET, R.; ZACHGO, W.; JUTHORST, T.; MAHLESA, D.; LISSON, R. & BOLM-AUDORFF, U.: Platinsalze als Berufsallergene. IN: Allergologie, 1989, 12: 152-157.
- [91] GLEICHMANN, E.; PALS, S.T.; ROLINK, A.G.; RADSZKIWICZ, T. & GLEICHMANN, H.: Graft-versus-host-reactions: Clues to the etiopathology of a spectrum of immunological diseases. IN: Immunol. Today, 1984, 5: 324-332.
- [92] GLEICHMANN, E.; VOHR, H.-W.; MIRTSCHEWA, J.; STILLER-WINKLER, R. & VOGELER, S.: Zur Induktion von Autoimmunkrankheiten und anderen stimulativen Immunopathien durch Quecksilber und andere Chemikalien.
IN: Umwelthygiene, Band 19, Verlag Stefan W. Albers, Leichlingen, 270-319.
- [93] GOLDMAN, M.; DRUET, P. & GLEICHMANN, E.: T_H2-cells in systemic autoimmunity: Insights from allogeneic diseases and chemically- induced autoimmunity. IN: Immunol. Today, 1991, 12:223-227.
- [94] KUBICKA-MURANYI, M.; BEHMER, O.; UHRBERG, M.; KLONOWSKI, H.; BISTER, J. & GLEICHMANN, E.: Murine systemic autoimmune disease induced by mercuric chloride (HgCl₂): Hg- specific helper T-cells react to antigen stored in macrophages. IN: Int. J. Immunopharmac., 1993, 15: 151-161.

- [95] BLOKSMA, N.; KUBICKA MURANYI, M.; SCHUPPE, H.-C.; GLEICHMANN, E. & GLEICHMANN, H.: Predictive immunotoxicological test systems: Suitability of the popliteal lymph node assay in mice and rats. IN: Critical Reviews in Toxicology, 1995, 25:369-396.
- [96] SCHUPPE, H.-C.; KULIG, J.; KÜHN, U.; LEMPertz, U.; KIND, P.; KNOP, J. & BECKER, D.: Immunostimulatory effects of platinum compounds: Correlation between sensitizing properties in vivo and modulation of receptor-mediated endocytosis in vitro. IN: Int. Arch. Immunol., 1997, 112: 125-132.
- [97] NORDLIND, K.: Further studies on the ability of different metal salts to influence the DNA synthesis of human lymphoid cells. IN: Int. Archs. Allergy appl. Immun., 1986, 79:83-85.
- [98] PAGELS, J.; Dissertation
- [99] ROMAGNOLI, P.; LABHARDT, A.M. & SINIGAGLIA, F.: Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. IN: EMBO J., 1991; 10: 1303-1306.
- [100] SINIGAGLIA, F.: The molecular basis of metal recognition by T cells. IN: J. Invest. Dermatol. 1994, 102: 398-401.
- [101] PISTOOR, F.H.M.; KAPSENBERG, M.L.; BOS, J.D.; MEINARDI, M.M.H.M.; VON BLOMBERG, B.M.E. & SCHEPERF, R.J.: Cross reactivity of human nickel-reactive T-lymphocyte clones with copper and palladium. IN: J. of Invest. Dermatol., 1995, VOL. 105, NO. 1: 92-95.
- [102] MOULON, C.; VOLLMER, J. & WELTZIEN, H.-U.: Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel. IN: Eur. J. Immunol., 1995, 25: 3308-3315.
- [103] KULIG, J.; RÖNNAU, A.; SACHS, B.; SCHÜRER, N.Y. & SCHUPPE, H.-Chr.: Contact hypersensitivity to palladium salts: demonstration of specific lymphocyte reactivity in vitro. IN: Arch. Dermatol. Res., 1997, 289: P120.
- [104] ISHII, N.; TAKAHASHI, K.; KAWAGUCHI, H. ; NAKAJIIMA, H.; TANAKA, S. & AOKI, I.: Genetic control of delayed-type hypersensitivity to

- chromium chloride. IN: Int. Arch. Allergy Immunol.; 1993, 100: 333-337.
- [105] TSE, Y. & COPPER, K.D.: Cutaneous dermal Ia⁺ cells are capable of initiating delayed type hypersensitivity responses.
IN: J. Invest. Dermatol., 1990, 94: 267-272
- [106] SCHULER, G.; KÄÜGEN, E.; HEUFLE, C.; KOCH, F. & ROMANI, N.:
Einfluß von Zytokinen auf die Funktion von Langerhans-Zellen.
IN: Allergologie, 1991, 5: 189-192.
- [107] KINNAIRD, A.; PETERS, S.W.; FOSTER, J.R. & KIMBER, I.: Dendritic cell accumulation in draining lymph nodes during the induction phase of contact allergy in mice. IN: Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1990, 89:202-210.
- [108] BARKER, J.N.W.N.: Role of keratinocytes in allergic contact dermatitis.
IN: Contact Dermatitis, 1992, 26: 145-148.
- [109] HAUSER, C.: Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. IN: J. Invest. Dermatol., 1990, 95: 436-440.
- [110] KULIG, J.; Dissertation.
- [111] ROMAGNOLI, P.; LABHARDT, A.M.; SINIGAGLIA, F.: Selective interaction of nickel with an MHC-bound peptide.
IN: The EMBO Journal, 1991, 10: 1303-1306.

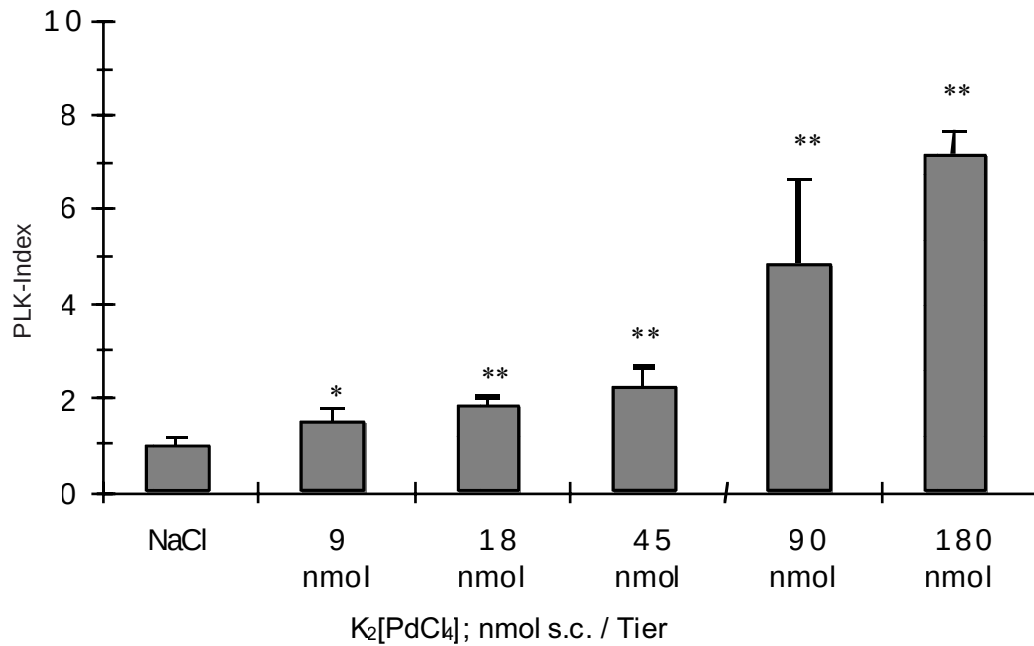


Abb. 4.1.1: Dosis-Wirkungsbeziehung der Primärantwort des PLK-Testes mit $K_2[PdCl_4]$ in BALB/c-Mäusen.

Gruppen von 5-6 Tieren wurde die angegebene Dosis subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die PLK-Indizes ermittelt.

Die Säulen repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (bezogen auf die NaCl-Kontrolle).

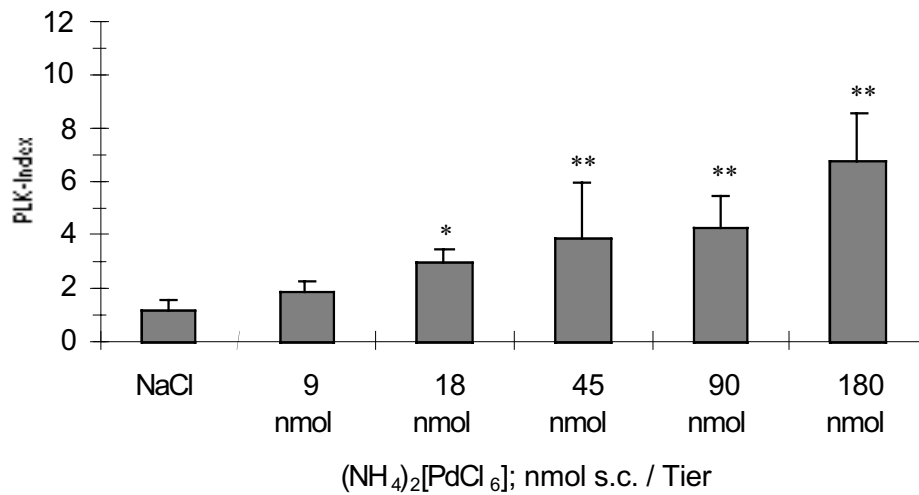


Abb. 4.1.2: Dosis-Wirkungsbeziehung der Primärantwort des PLK-Testes mit (NH₄)₂[PdCl₆] in BALB/c-Mäusen.

Gruppen von 5-6 Tieren wurde die angegebene Dosis subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die PLK-Indizes ermittelt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

*p < 0,05; ** p < 0,01 (bezogen auf die NaCl-Kontrolle).

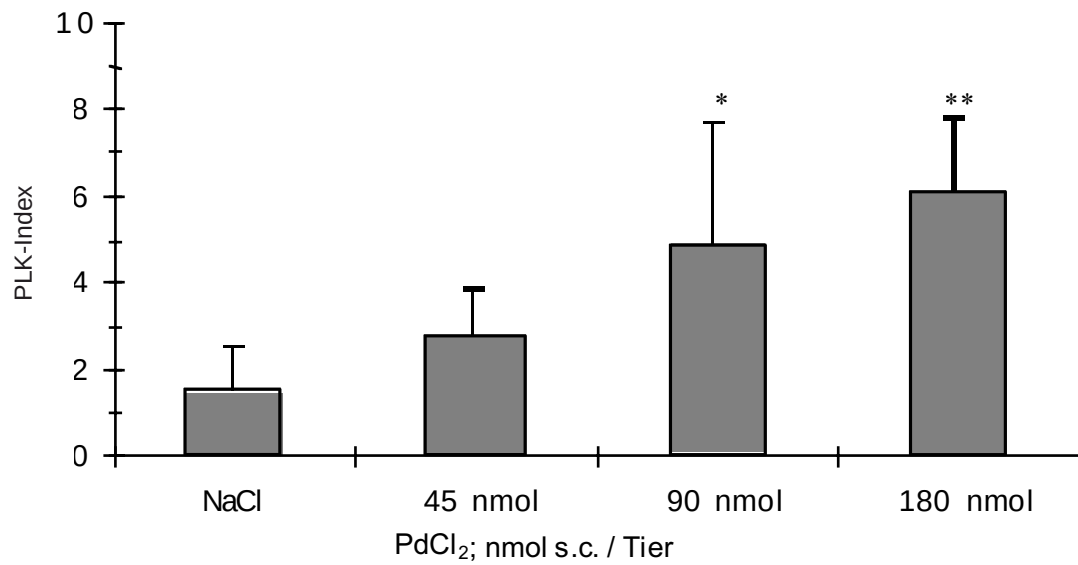


Abb. 4.1.3: Dosis-Wirkungsbeziehung der Primärantwort des PLK-Testes mit PdCl₂ in BALB/c-Mäusen.

Gruppen von 5-6 Tieren wurde die angegebene Dosis subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die PLK-Indizes ermittelt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (bezogen auf die NaCl-Kontrolle).

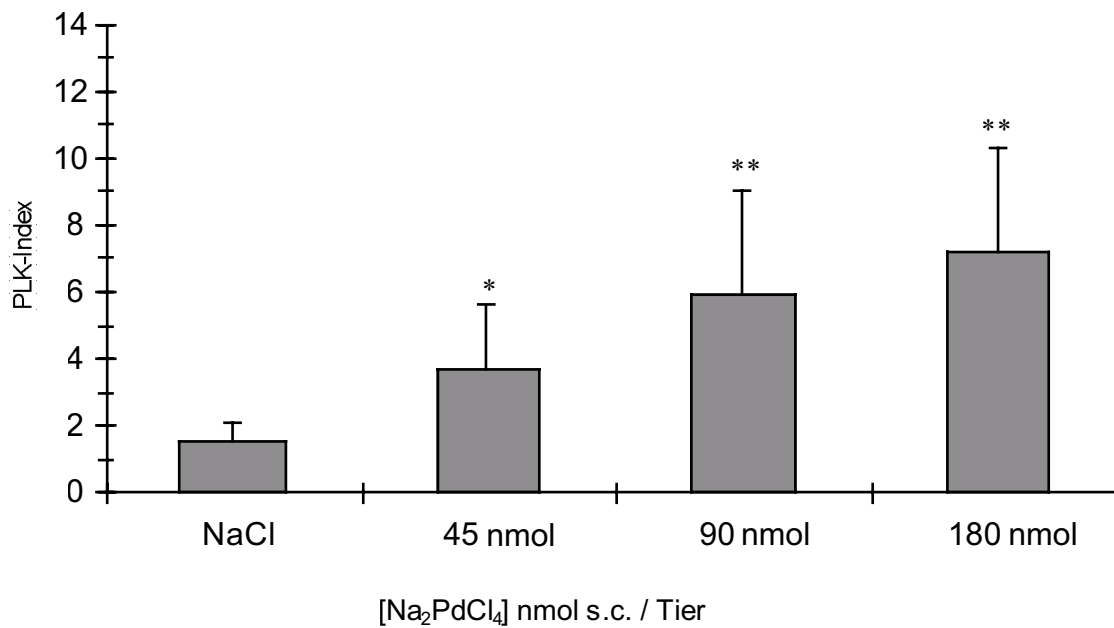


Abb. 4.1.4: Dosis-Wirkungsbeziehung der Primärantwort des PLK-Testes mit Na_2PdCl_4 in BALB/c-Mäusen.

Gruppen von 5-6 Tieren wurde die angegebene Dosis subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die PLK-Indizes ermittelt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

* p < 0,05; ** p < 0,01 (bezogen auf die NaCl-Kontrolle).

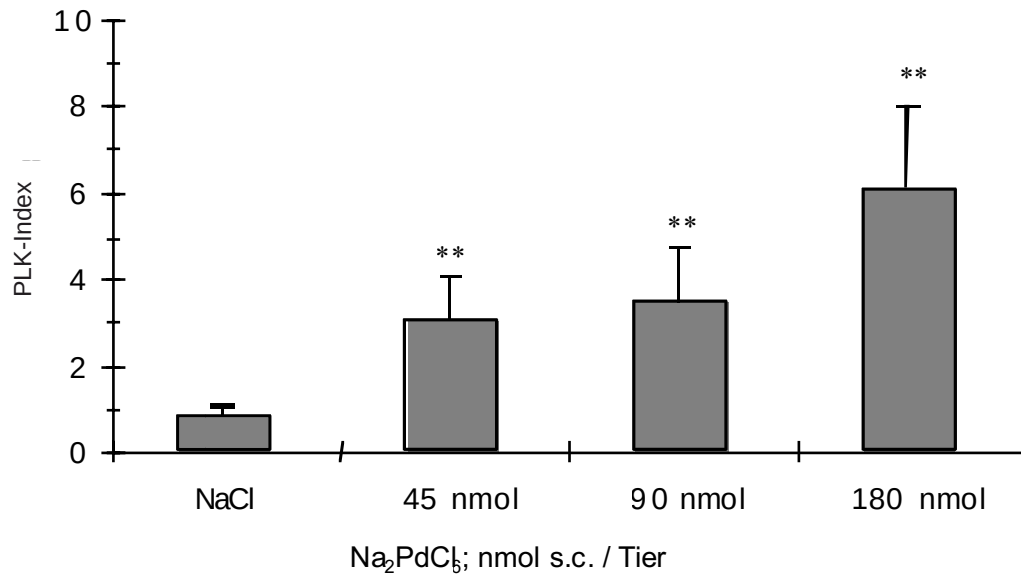


Abb. 4.1.5: Dosis-Wirkungsbeziehung der Primärantwort des PLK-Testes mit Na₂PdCl₆ in BALB/c-Mäusen.

Gruppen von 5-6 Tieren wurde die angegebene Dosis subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die PLK-Indizes ermittelt.

Die Säulen repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

* p < 0,05; ** p < 0,01 (bezogen auf die NaCl-Kontrolle).

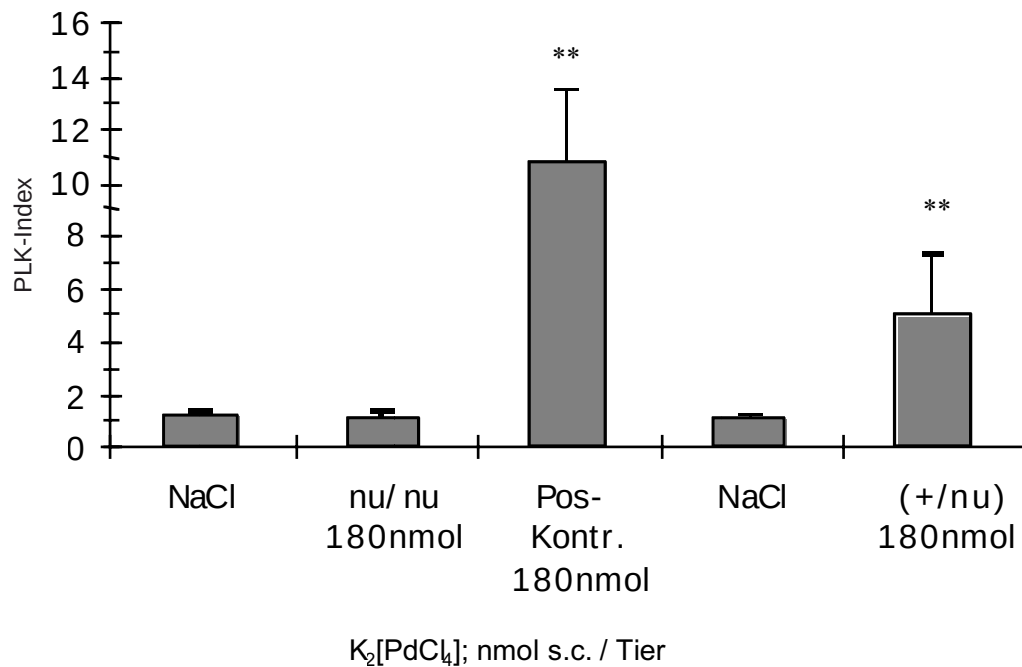


Abb. 4.1.6: T-Zell-Abhängigkeit der Primärantwort des PLK-Testes mit $K_2[PdCl_4]$ in Mäusen des Stammes (NMRI nu/nu) und (NMRI +/nu).

Gruppen von 5-6 Tieren wurde die angegebene Dosis subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die PLK-Indizes ermittelt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (bezogen auf die NaCl-Kontrolle).

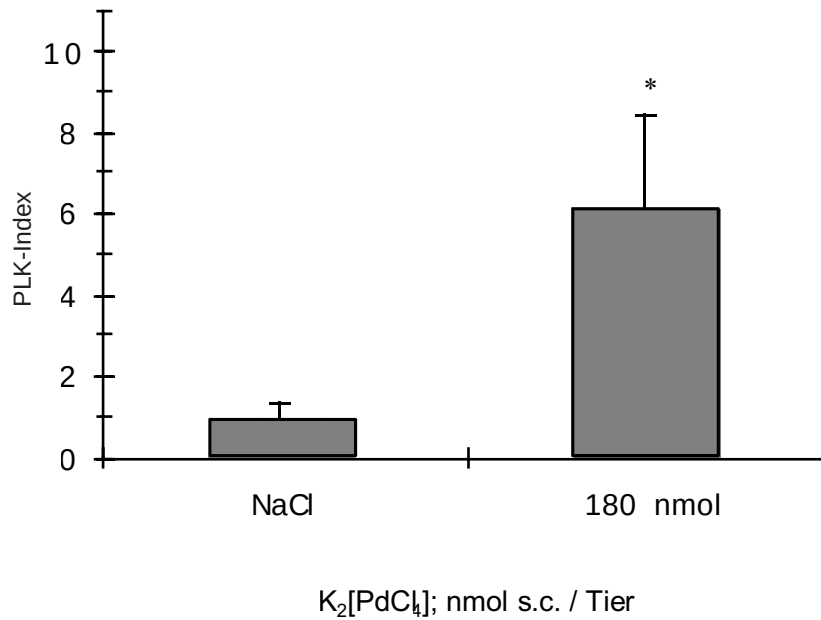


Abb. 4.1.7: Primärantwort des PLK-Testes mit $K_2[PdCl_4]$ in C57/BL6-Mäusen. Gruppen von 5-6 Tieren wurde die angegebene Dosis subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die PLK-Indizes ermittelt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (bezogen auf die NaCl-Kontrolle).

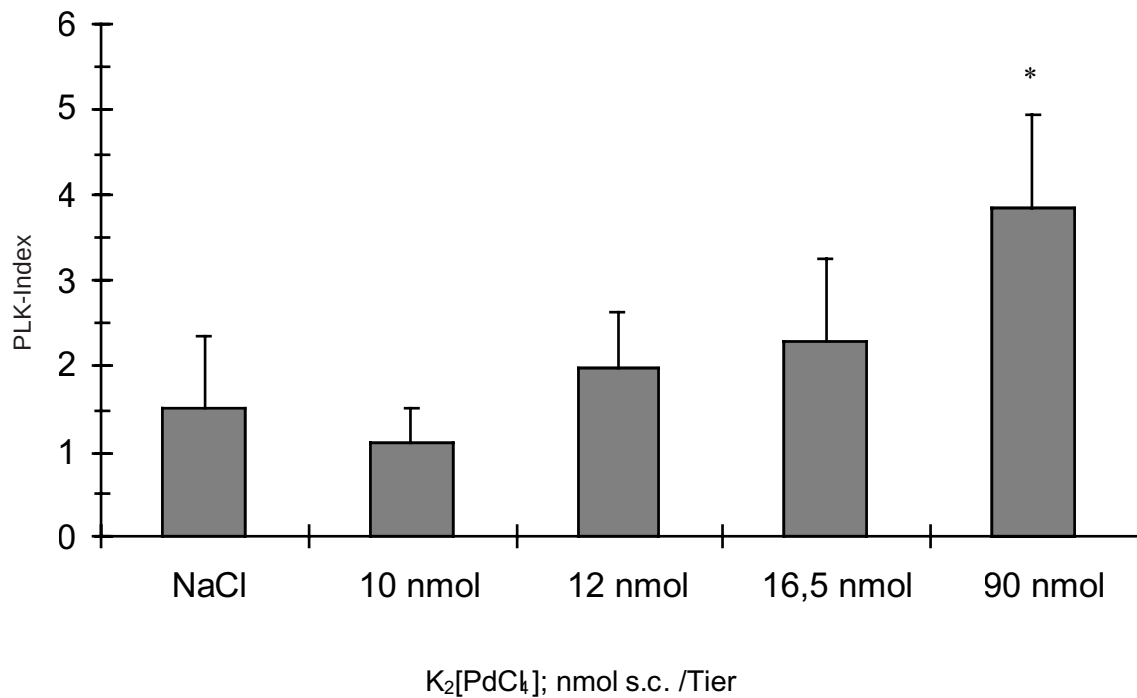


Abb. 4.1.8: Bestimmung der subimmunogenen Dosis in der Primärantwort des PLK-Testes mit K₂[PdCl₄] in BALB/c-Mäusen.

Gruppen von 5-6 Tieren wurde die angegebene Dosis subkutan in die linke Hinterpfote appliziert. Am Tag 6 wurden die PLK-Indizes ermittelt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

* p < 0,05; ** p < 0,01 (bezogen auf die NaCl-Kontrolle).

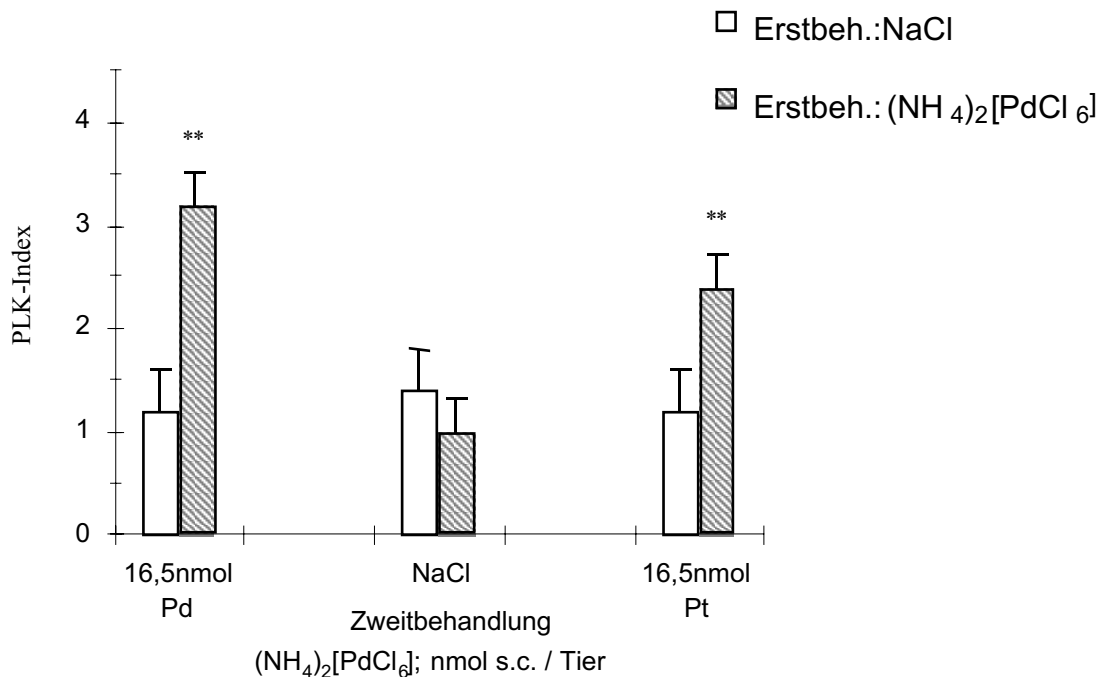


Abb. 4.2 : Sekundärantwort des PLK-Testes mit $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ in BALB/c-Mäusen.

Gruppen von 5-6 Tieren wurden über 11 Wochen nasal mit 3,6 nmol $(\text{NH}_4)_2[\text{PdCl}_6]$ behandelt. Es folgte ein sechswöchiges behandlungsfreies Intervall. In der 18. Woche wurden die Tiere mit den angegebenen Substanzen in suboptimaler Dosierung s.c. in die linke Hinterpfote restimuliert. Am Tag 2 nach Restimulation wurden die PLK-Indizes ermittelt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. ** $p < 0,01$ (bezogen auf die entsprechende Kontrolle, die während der Langzeitbehandlung mit NaCl exponiert wurde).

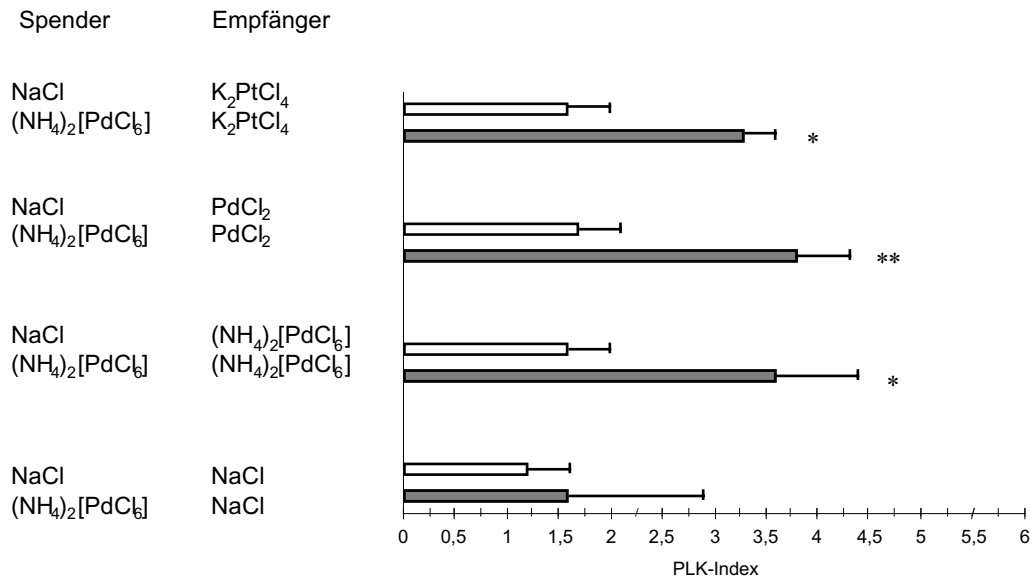


Abb. 4.3.1: „Pd“-spezifische zelluläre Immunität nach chronisch nasaler Behandlung von BALB/c-Mäusen mit $(NH_4)_2[PdCl_6]$ mit Nachweis der Kreuzreaktion der transferierten Zellen gegenüber verschiedenen Pd- und Pt-Verbindungen im Adoptiv-Transfer-PLK-Test.

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 11 Wochen behandelt. Es folgte ein sechswöchiges behandlungsfreies Intervall. Die Milzzellen der Spendertiere wurden entnommen und in einer Dosierung von $1,6 \times 10^7$ Zellen in syngene Empfängertiere übertragen. Am Tag 1 nach Zelltransfer erfolgte die Restimulation, der wie oben angegebenen Verbindungen, in suboptimaler Dosierung von 16,5 nmol s.c. in die linke Hinterpfote. PLK-Indizes wurden an Tag 7 nach Injektion der Milzzellen ermittelt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (bezogen auf die jeweiligen Kontrollen, die Milzzellen von NaCl-behandelten Spendern erhielten).

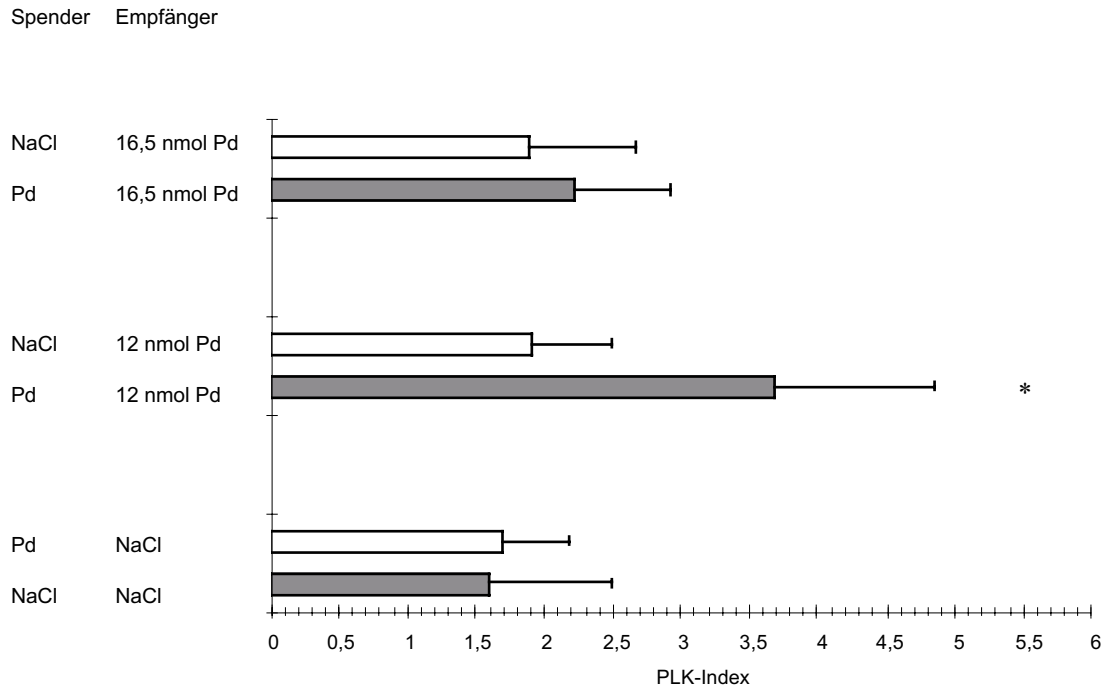


Abb. 4.3.2: „Pd“-spezifische zelluläre Immunantwort nach chronisch nasaler Behandlung von BALB/c-Mäusen mit $K_2[PdCl_4]$ im Adoptiv-Transfer-PLK-Test.

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 11 Wochen behandelt. Es folgte ein vierzehnwöchiges behandlungsfreies Intervall. Die Milzzellen der Spendertiere wurden entnommen und in einer Dosierung von $1,6 \times 10^7$ Zellen in syngene Empfängertiere übertragen. Am Tag 1 nach Zelltransfer erfolgte die Restimulation in oben angegebener suboptimaler Dosierung s.c. in die linke Hinterpfote. Die PLK-Indizes wurden an Tag 7 nach Injektion der Milzzellen ermittelt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung. * $p < 0,05$ (bezogen auf die jeweiligen Kontrollen, die Milzzellen von NaCl-behandelten Spendern erhielten).

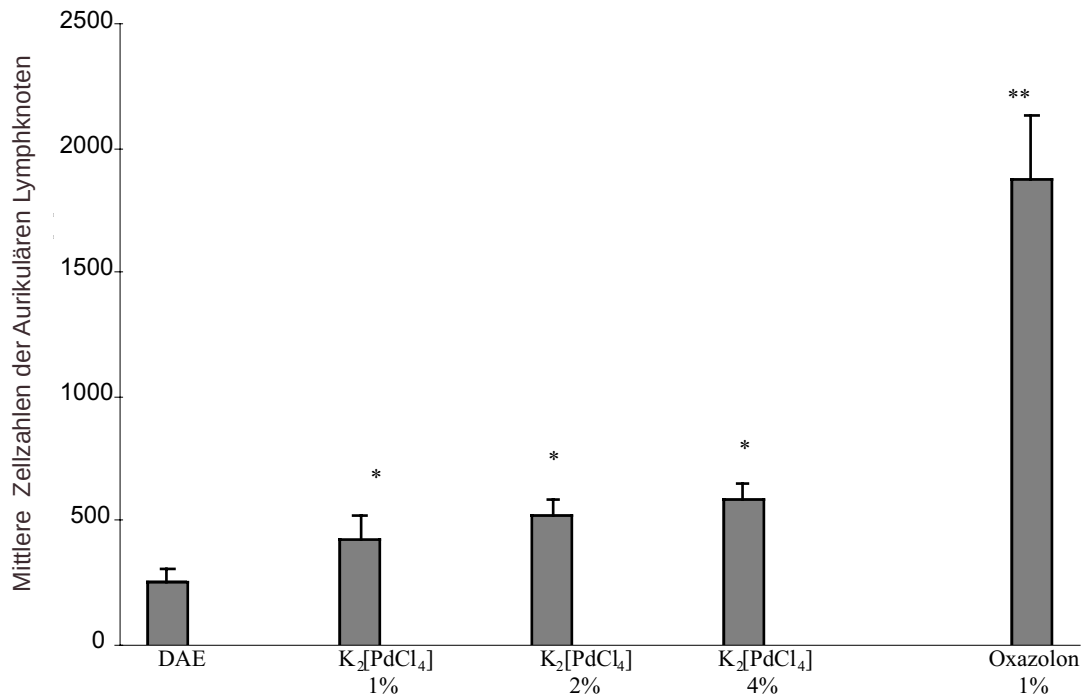


Abb. 4.4.1: Auslösung einer Kontaktsensibilisierung gegen K₂[PdCl₄] durch viertägige Behandlung von BALB/c-Mäusen im ALK-Test.

Die Tiere wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit den entsprechenden Lösungen auf der Außenseite ihrer beider Ohren behandelt. Es wurde ein Tag Pause eingehalten. Die Auswertung erfolgte am Tag 5 des Experimentes durch Entnahme der aurikulären Lymphknoten. Die mittlere Zellzahl beider Lymphknoten der Tiere einer Gruppe wurde gebildet. Die Balken repräsentieren den Mittelwert +/- Standard-abweichung. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01 (bezogen auf die mittlere Zellzahl der DAE-Kontrollgruppe).

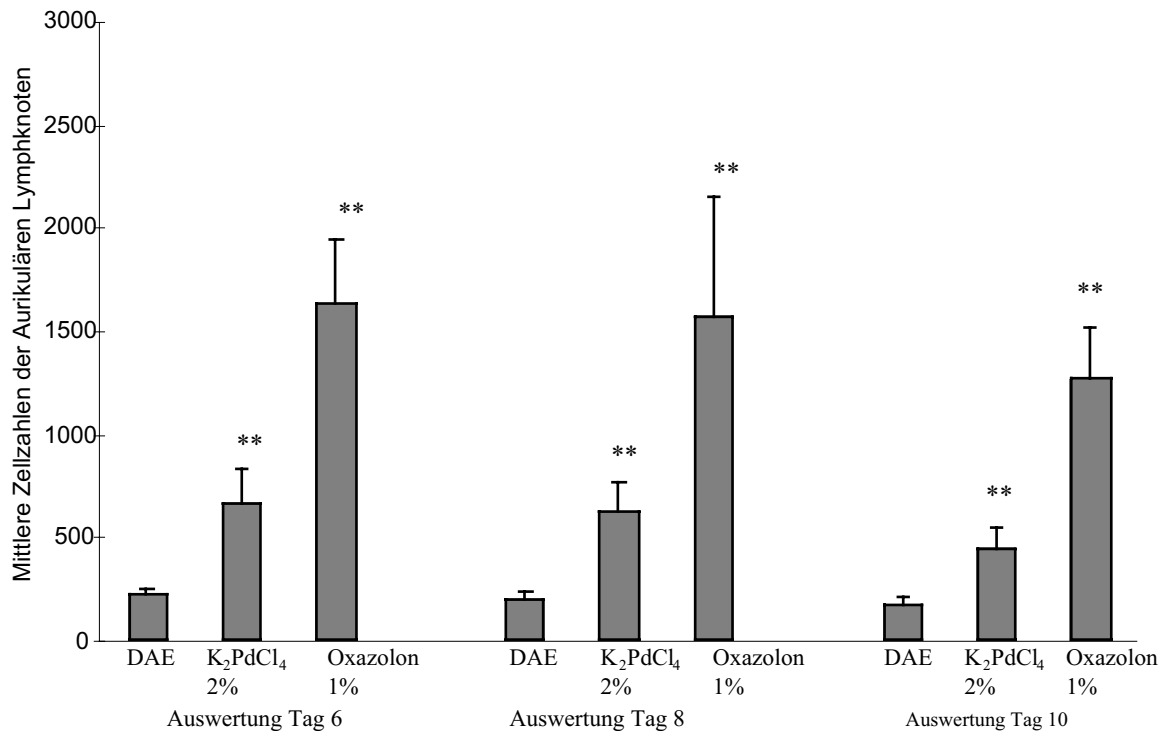


Abb. 4.4.2: Kinetik einer Kontaktsensibilisierung gegen K₂[PdCl₄] durch fünftägige Behandlung von BALB/c-Mäusen im ALK-Test.

Die Tiere wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit den oben angegebenen Lösungen auf der Außenseite ihrer beider Ohren behandelt. Es wurde ein Tag (Auswertung Tag 6), drei Tage (Auswertung Tag 8) und fünf Tage (Auswertung Tag 10) behandlungsfreies Intervall eingehalten. Es folgte die Auswertung mit Entnahme der Aurikulären Lymphknoten. Die mittlere Zellzahl beider Lymphknoten der Tiere einer Gruppe wurde gebildet. Die Balken repräsentieren den Mittelwert +/- Standardabweichung.

** $p \leq 0,01$ (bezogen auf die mittlere Zellzahl der entsprechenden DAE-Kontrollgruppe).

Lebenslauf

Name: Andrea Wiesenborn
 Geburtsdatum: 02.06.1970
 Konfession: evangelisch
 Ehemann: Hartmut Grüger
 26.01.1969
 Oberarzt der Klinik für Pneumologie, Allergologie
 und Schlafmedizin der Kaiserswerther Diakonie
 Kinder: Jana Katharina Wiesenborn
 31.05.1996
 Julian Thorben Wiesenborn
 22.09.2001
 Eltern: Wilfried Wiesenborn
 Hannelore Gisela Wiesenborn
 Adresse: Im Winkel 6
 40670 Meerbusch

Ausbildung:

1976-1980 Ev. Grundschule Erkelenz
 1980-1989 Cornelius-Burgh-Gymnasium Erkelenz
 05/1989 Abitur
 April 1990 Studium der Humanmedizin an der
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 3/1992 Ärztliche Vorprüfung
 3/1993 1. Staatsexamen
 3/1996 2. Staatsexamen
 4/1997- 3/1998 Praktisches Jahr
 in den Medizinischen Einrichtungen
 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 7/1998-1/2000 Ärztin im Praktikum
 in der Hautklinik der HHU-Düsseldorf,
 Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka
 Seit 1/2000 Assistentenärztin
 in der Hautklinik der HHU-Düsseldorf,
 Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

Publikationen:

1. Pauls K, Schön M, Kubitza RC, Homey B, Wiesenborn A, Lehmann P, Ruzicka T, Parker CM, Schön MP
Role of integrin alphaE (CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes.
 J Invest Dermatol. 2001 Sep; 117(3):569-75.

2. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Müller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A
Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis.
 J Immunol. 2000 Jun 15;164(12):6621-32.

3. Homey B, Wang W, Soto H, Buchanan ME, Wiesenborn A, Catron D, Müller A, McClanahan TK, Dieu-Nosjean MC, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Oldham E, Zlotnik A.
Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor (GPR-2,CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC).
 J Immunol. 2000 Apr. 1;164(7):3465-70.

Abstract der Dissertation von Andrea Wiesenborn

„Auslösung primärer und sekundärer zellulärer Immunantworten durch Chloropalladate bei der Maus“

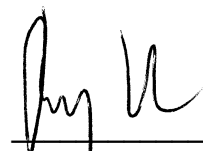
In jüngerer Zeit häufen sich die Fallberichte und klinischen Studien bezüglich der Sensibilisierungsraten verschiedener Chloropalladate. In der Normalbevölkerung konnte eine Sensibilisierungsrate von 7% auf Palladium ermittelt werden .

Die Sensibilisierung auf Palladium äußert sich als Typ IV-Reaktion, d. h. als Kontaktdermatitis, -mukositis, oder seltener als oraler Lichen planus, seltener als Typ I-Reaktion. Aufgrund des häufigen Vorkommens von Palladiumverbindungen in Dentallegierungen, Katalysatoren und in der Schmuckindustrie ist die Untersuchung der zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen von großer Bedeutung.

Ziel dieser Studie war es deshalb das immunogene Potential der Palladiumverbindungen $K_2[PdCl_4]$, $(NH_4)_2[PdCl_6]$, $PdCl_2$, Na_2PdCl_4 und Na_2PdCl_6 in Experimenten mit BALB/c-, C57Bl/6- und NMRI-Mäusen zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass schon einmalige s.c. Injektionen von Dosierungen im nmol-Bereich (45-180 nmol) ausreichend waren, um eine dosisabhängige, primäre Immunantwort im Popliteal-Lymphknoten (PLK)-Test, auszulösen. Um eine Sensibilisierung gegen Palladiumverbindungen nachzuweisen, wurden die Mäuse chronisch nasal und damit physiologisch mit $(NH_4)_2[PdCl_6]$ belastet. Es konnte eine systemische, Pd-spezifische, T-Zell-abhängige Reaktion in der PLK-Zweitantwort am gleichen Tier demonstriert werden. Zusätzlich konnte im Adoptiv-Transfer-PLK-Test nach 11-wöchiger nasaler Belastung (3,6 nmol/ 25 l) mit $(NH_4)_2[PdCl_6]$ und $K_2[PdCl_4]$, durch den Transfer von Milzzellen in syngene, unbehandelte Geschwistertiere die systemische, Pd-spezifische, zelluläre Immunantwort demonstriert werden. In diesen Experimenten zeigte sich eine Kreuzreaktivität mit Chloroplatinaten. Neben der nasalen und subkutanen Applikation konnte auch durch topische Gabe von $K_2[PdCl_4]$ eine Sensibilisierung erreicht werden. Es wurde eine Pd-spezifische, kontaktallergische Reaktion induziert, die sich durch den aurikulären Lymphknoten (ALK)-Test quantifizieren ließ.

In dieser Dissertation wurde erstmals gezeigt, dass Chloropalladate im Mausmodell über ein erhebliches T-Zell-sensibilisierendes Potential verfügen. Inwieweit diese Ergebnisse auf das humane System übertragbar sind, und welche zellulären Mechanismen dem zugrunde liegen bleibt die Aufgabe zukünftiger Studien.



Prof. Dr. med. P. Lehmann