

## Forschung

### Wirkungen von p-Phenylendiamin und Dispersionsorange 3 auf die aurikulären Lymphknoten bei der Maus

R. Stahlmann<sup>1</sup>, T. Wannack<sup>1</sup>, K. Riecke<sup>1</sup>, T. Platzek<sup>2</sup>

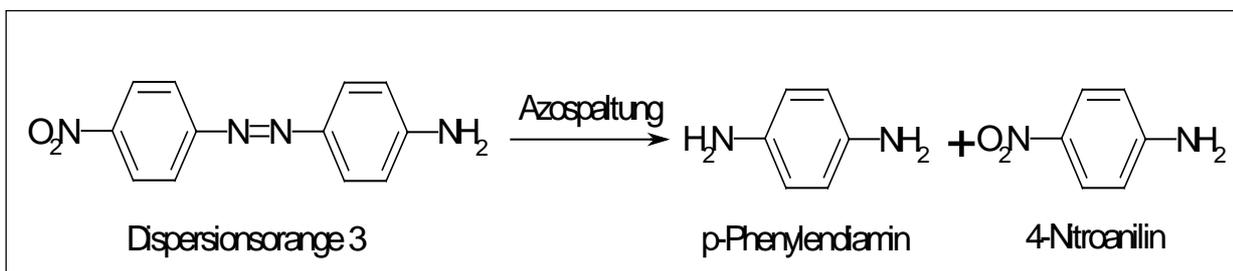
<sup>1</sup> Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, FU Berlin

<sup>2</sup> BgVV

## Einleitung

Ziel der Arbeiten war die Untersuchung des allergenen Potenzials von Dispersionsorange 3 (DO3) und dessen "physiologischen" Metaboliten p-Phenylendiamin (pPD). Wie kürzlich beschrieben, sind Hautbakterien wie *Staphylococcus epidermidis* und *Micrococcus 0301* zu dieser Spaltung befähigt (Abb. 1). (Platzek et al. Hum Exp Tox 18:552-559, 1999).

**Abbildung 1:** Metabolismus von Dispersionsorange 3 durch Hautbakterien



## Material und Methoden

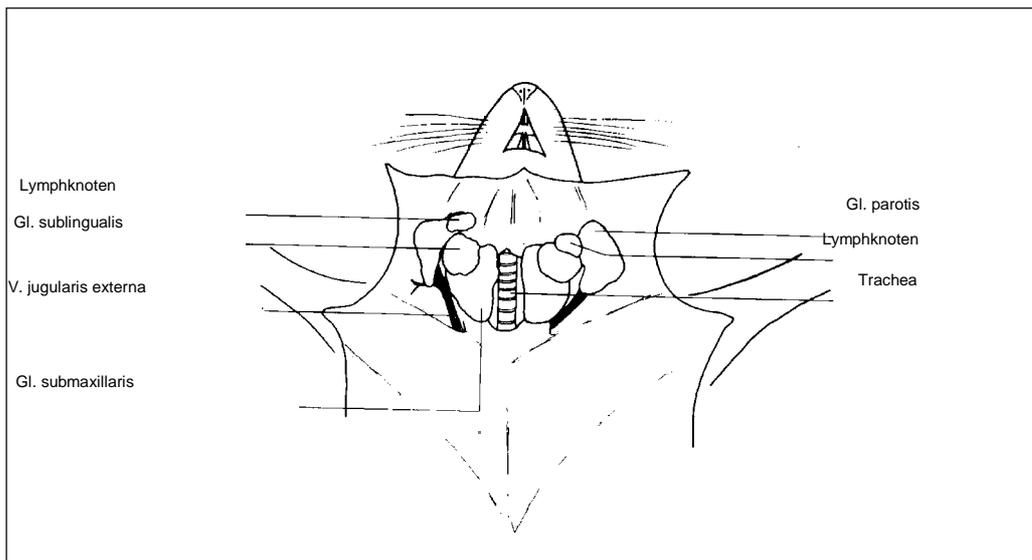
### Testsubstanzen

- DO3 10%
- pPD 1% und 3%
- Dinitrochlorbenzol (DNCB) 1%
- Vehikel (Aceton/Olivenöl 4:1)

### Behandlung

6 Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse wurden 1x täglich von Tag 1-3 auf der Hinterseite des linken Ohres mit 25 µl der Testsubstanz und rechts mit dem Vehikel behandelt. An Tag 5 wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet und die Lymphknoten (LK) präpariert (Abb. 2).

## Abbildung 2: Präparation der aurikulären Lymphknoten



### Endpunkte

- Ohrdicke Tag 5; Mikrometer, Oditest
- Lymphknotengewicht rechts und links
- Zellzahl der LK; Sysmex A 820
- Oberflächenantigene der Lymphozyten
- Expression von CD4, CD8, CD45, CD69 und I-A (*Durchflusszytometrie*), FACScan (Becton Dickinson), Heidelberg

Bei der Untersuchung von CD4, CD8 und CD45 wurden getrennte positive oder negative Populationen gefunden. Für diese Antikörper wurde daher der Anteil der positiven Zellen angegeben. Mit den Antikörpern I-A und CD69 ließen sich keine diskreten Populationen nachweisen. Daher wurde für diese Antikörper die mediane Fluoreszenz der Zellen ausgewertet. Statistische Vergleiche wurden paarweise im Seitenvergleich mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt.

## Ergebnisse

Die untersuchten Endpunkte waren bei den Vehikelkontrollen im Seitenvergleich nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich bei der Ohrstärke zeigte sich ein geringer, aber statistisch signifikanter Unterschied (0,02 mm, Median, Abb. 3).

Bei den Versuchen mit der Positivkontrolle DNCB unterschieden sich das LK-Gewicht (Abb. 4), die Ohrstärke, die Zellzahl (Abb. 5) und die Oberflächenepitope I-A (Abb. 6), CD45 (Abb. 7) im Seitenvergleich signifikant ( $p < 0,05$ , Wilcoxon Test). CD69 (Abb. 8) nahm tendenziell zu. DNCB vergrößerte zudem die Streuung der Endpunkte LK-Gewicht, Zellzahl, CD69 und CD4 (Abb. 9). DO3 verursachte lediglich eine geringe, statistisch signifikante Zunahme der Ohrstärke in der selben Größenordnung wie die des Vehikels.

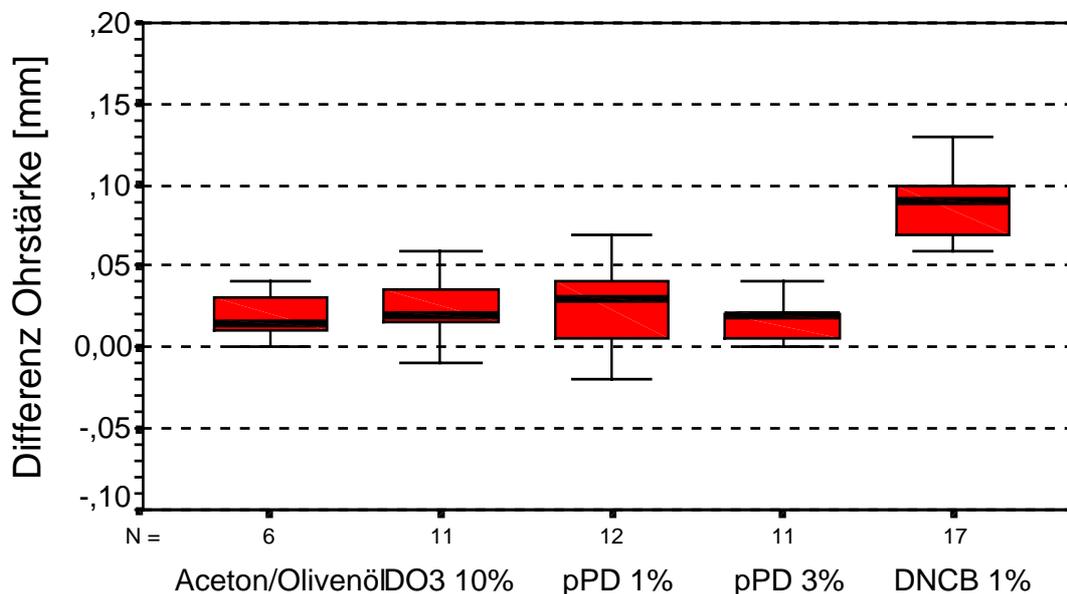
Der Metabolit pPD verursachte in 1%iger Konzentration einen deutlichen Anstieg des LK-Gewichts. Bei der Ohrstärke gab es einen statistisch signifikanten Anstieg, der aber wiederum in der Größenordnung der Vehikelkontrolle lag. Von den Oberflächenepitopen reagierte das I-A-Molekül auf die Behandlung mit dem Metaboliten mit einem signifikanten Anstieg.

Die Behandlung mit dem selben Metaboliten in 3%iger Konzentration erbrachte prinzipiell ähnliche Ergebnisse, nur daß es hier zu einer tendenziellen Vermehrung der CD45<sup>+</sup> Zellen kam und nicht zu einer signifikant vermehrten Expression des I-A Oberflächenepitops. Weiterhin konnte ein Trend zu einer vermehrten Expression von CD69 festgestellt werden.

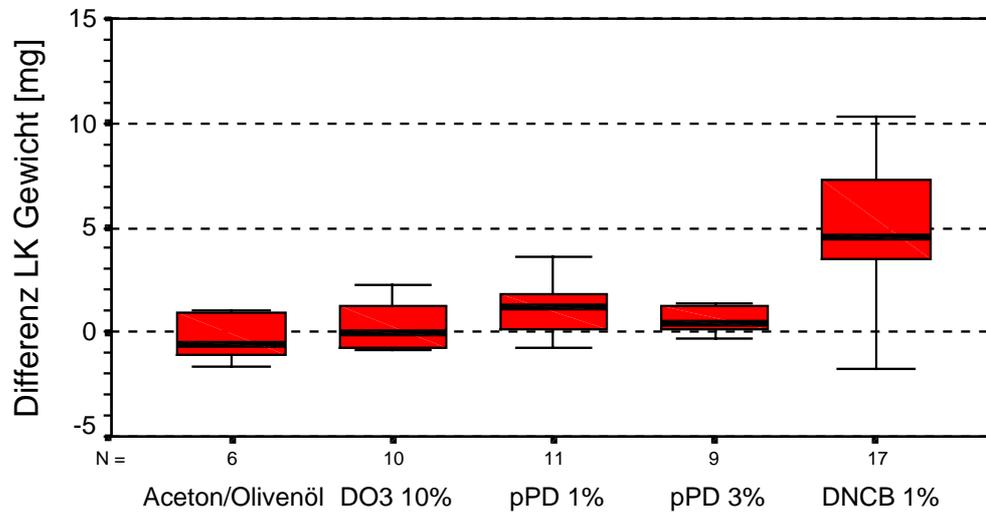
## Diskussion

Die Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf ein direktes allergenes Potential von DO3, während wir nach Behandlung mit pPD neben einer Zunahme des LK-Gewichtes in den beiden untersuchten Konzentrationen weitere Hinweise für ein allergisierendes Potenzial fanden: Eine Zunahme von I-A in 1%iger Konzentration und tendenzielle Zunahmen von CD45<sup>+</sup> Zellen und von CD69 in 3%iger Konzentration. Bei dem Epitop CD69 handelt es sich um einen sogenannten "very early activation factor". Möglicherweise ist das Maximum der Wirkung zum Messzeitpunkt bereits vorüber. Die Fortsetzung unserer Untersuchung soll klären, ob ein signifikanter Anstieg von CD45<sup>+</sup> Zellen und von CD69 im Seitenvergleich zu einem früheren Zeitpunkt festzustellen ist.

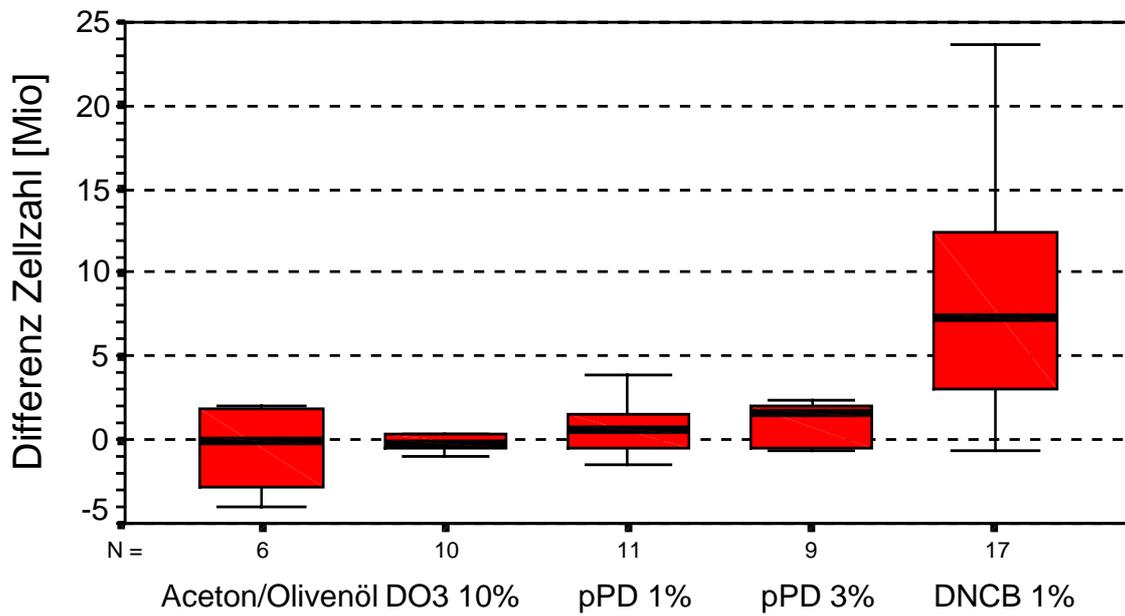
**Abbildung 3:** Veränderung der Ohrstärke



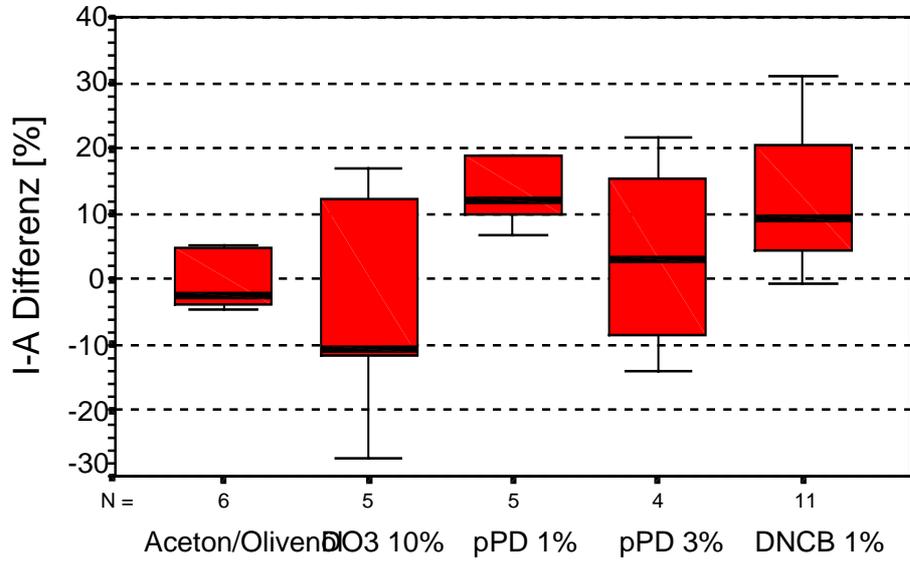
**Abbildung 4:** Veränderung des LK-Gewicht



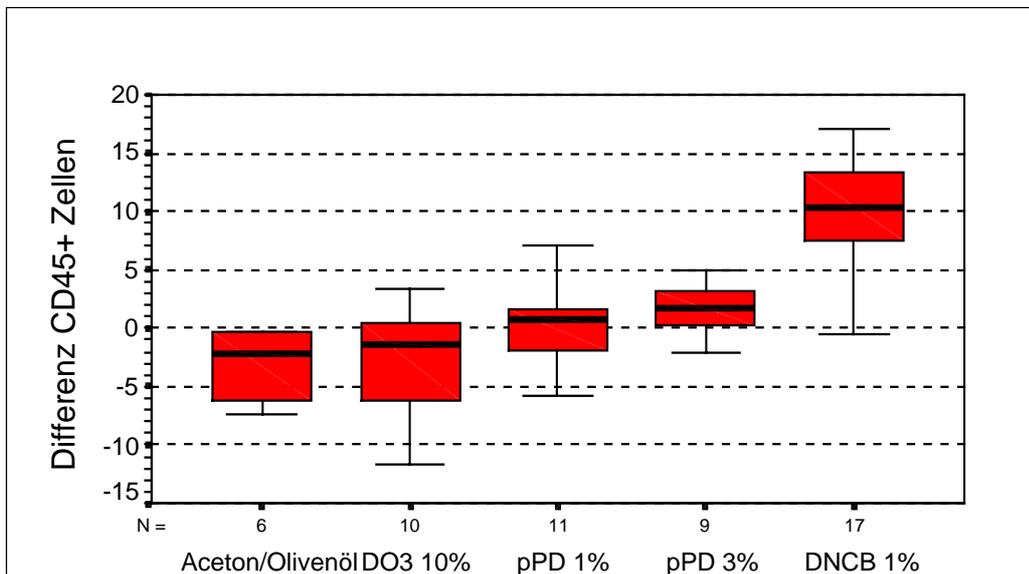
**Abbildung 5:** Veränderung der LK-Zellzahl



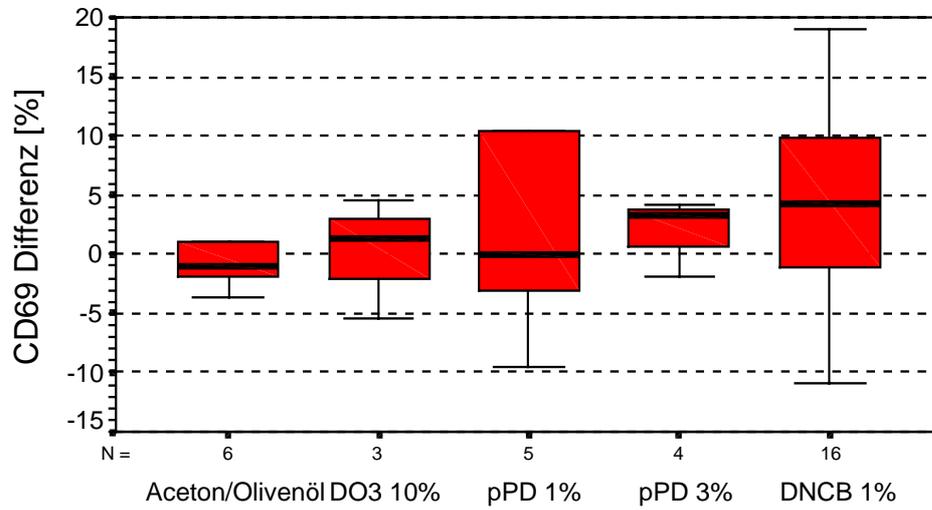
**Abbildung 6:** Veränderung von I-A



**Abbildung 7:** Veränderung der CD45<sup>+</sup> Zellen



**Abbildung 8:** Veränderung von CD69



**Abbildung 9:** Veränderung der CD4<sup>+</sup> Zellen

